50376
1992
55

61 298

50376
1992
55

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
LILLE - FLANDRES - ARTOIS

N° d'ordre 878

THESE

présentée par

ABDERRAHIM ACHBAROU

pour l'obtention du

DOCTORAT DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
DE L'UNIVERSITE DE LILLE - FLANDRES - ARTOIS

CARACTERISATION DE PROTEINES DES MICRONEMES ET DES GRANULES DENSES CHEZ *TOXOPLASMA GONDII*

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES

Soutenu le 21 février 1992 devant le jury

René CACAN
Daniel CAMUS
Rolf ENTZEROTH
Jean-François DUBREMETZ
Odile MERCEREAU-PUIJALON
André VERBERT

930

UNITE DE BIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE PARASITAIRES ET FONGIQUES
INSERM U 42, VILLENEUVE D'ASCQ

Avant propos

Toute ma reconnaissance au Professeur Daniel CAMUS pour m'avoir accueilli dans son unité. Il m'a beaucoup apporté au cours de ma formation. Je lui adresse mes vifs remerciements et mes respectueuses considérations.

L'aboutissement de ce travail est du à la patience, au savoir-faire et à l'expérience du Docteur Jean-François DUBREMETZ, qui a su me faire partager sa passion. Je voudrais lui témoigner ma grande reconnaissance et mes vifs remerciements.

Je remercie vivement le Docteur Odile MERCEREAU-PUIJALON d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Je tiens à la remercier également pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée pour la réalisation de ce travail.

J'ai l'honneur d'avoir parmi les membres de mon jury le Professeur André VERBERT, le Professeur René CACAN et le Docteur Rolf ENTZEROTH. Je leur adresse mes respectueuses considérations et mes vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Toute ma gratitude aux membres de l'unité 42, chercheurs, étudiants, techniciens et tout le personnel, qui ont contribué à l'aboutissement de ma formation. Je tiens à saluer la disponibilité particulière de Anne LOYENS, Marlène MORTUAIRE et Isabelle BRICHE, qui m'ont beaucoup aidé durant ces trois années.

CARACTERISATION DE PROTEINES DE MICRONEMES ET DE GRANULES DENSES CHEZ *TOXOPLASMA GONDII*

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

GENERALITES 4

I-TAXONOMIE DE *TOXOPLASMA GONDII* 5

II-CYCLE BIOLOGIQUE 5

III-ORGANISATION ULTRASTRUCTURALE DE *TOXOPLASMA GONDII* 7

III-1-Inclusions cytoplasmiques 7

III-2-La pellicule 8

III-3-Système microtubulaire 9

III-4-Complexe apical 9

IV-TOXOPLASMOSE 10

V-INTERACTION APICOMPLEXA-CELLULE HOTE 13

V-1-Différentes étapes de l'invasion 15

V-1-1-Reconnaissance et attachement 16

V-1-1-1-Description 16

V-1-1-2-Implication des organites du complexe apical dans le phénomène d'attachement 17

V-1-2-Formation de la jonction mobile et progression du parasite à l'intérieur de la cellule hôte 19

V-1-2-1-Description 19

V-1-2-2-Rôles des organites du complexe apical dans l'étape de pénétration 21

V-1-3-Motilité des parasites et invasion 23

V-2-Installation du parasite dans la vacuole parasitophore 24

VI-DONNEES ACTUELLES SUR LES ORGANITES DU COMPLEXE APICAL DE *TOXOPLASMA GONDII* 26

VII-BUT DU TRAVAIL 28

MATERIELS ET METHODES 29

A-MATERIELS BIOLOGIQUES 30

I-ANIMAUX 30

II-PARASITES 30

III-CELLULES UTILISEES POUR LE DEVELOPPEMENT IN VITRO DES TACHYZOITES DE *TOXOPLASMA GONDII* 30

IV-CELLULES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX 30

B-METHODES 31

I-CULTURE CELLULAIRE 31

I-1-Entretien des parasites 31

I-2-Culture et entretien des cellules utilisées pour le développement in vitro des tachyzoites 32

I-3-Cultures des cellules utilisées pour la production des anticorps monoclonaux 33

I-4-Production des anticorps monoclonaux 33

I-4-1-Immunisation des souris 33

I-4-2-Préparation des lymphocytes 34

I-4-3-Hybridation cellulaire 34

I-4-4-Sélection des hybrides 34

I-4-5-Clonages des hybridomes 35

I-4-6-Production massive des anticorps monoclonaux 35

I-5-Cryopréservation 36

II-MARQUAGES METABOLIQUES 36

II-1-Utilisation d'acides aminés radiomarqués 36

II-1-1-Marquage métabolique des tachyzoïtes en milieu acellulaire 37

II-1-2-Marquage métabolique des tachyzoïtes intracellulaires 37

II-1-2-1-Marquage métabolique long 37

II-1-2-2-Marquage court 38

II-2-Marquage par les acides gras 38

II-3-Marquage par la glucosamine 39

III-TECHNIQUE IMMUNOCHIMIQUES 39
III-1-Préparation des immunoadsorbants 39
III-1-1-Immunoadsorbant à partir de sérum de lapin 39
III-1-2-Imunoadsorbant à partir d'IgG de souris 39
III-1-2-1-Adsorbtion des IgG sur un complexe immunoglobulines de lapin anti souris-protéine A-sépharose CL-4B 39
III-1-2-2-Couplage des immunoglobulines purifiées sur la sépharose 4B-CNBr 40
III-1-2-2-1-Chromatographie d'exclusion sur gel 40
III-1-2-2-2-Chromatographie d'échange d'ions 40
III-1-2-2-3-Couplage des immunoglobulines purifiées 41
III-2-Immunoprécipitation des protéines radiomarquées 41
III-2-1-Solubilisation des cellules 41
III-2-2-Formation des immunocomplexes 42
III-3-Purification par affinité des protéines parasitaires 42
III-3-1-Lysat parasitaire 42
III-3-2-Immunoadsorbtion par chromatographie d'affinité 43
III-4-Purification des protéines recombinantes 43
III-4-1-Préparation des bactéries transformées 43
III-4-2-Culture bactérienne et expression des protéines de fusion (à activité βgalactosidase) 44
III-4-3-Dosage de l'activité βgalactosidasique 44
III-4-5-Chromatographie d'affinité 45
III-5-Production des sérums polyclonaux monospécifique 46

IV-TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES 46
IV-1-Analyse monodimensionnelle des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (SDS-PAGE) 46
IV-2-Analyse bidimensionnelle des protéines par isoélectrofocalisation et SDS-PAGE: 2D-électrophorèse 47
IV-3-Electrophorèse préparative et électroélution des protéines 48
IV-4-Détection des protéines par coloration au nitrate d'argent 48
IV-5-Fluorographie 49
IV-6-Electrotransfert 49
IV-7-Immunoempreinte 50

V-ESSAIS D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE 51
V-1-Immunofluorescence sur parasites isolés 51
V-2-Immunofluorescence sur des tachyzoïtes en culture cellulaire 52

VI-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 52
VI-1-Etude ultrastructurale de l'invasion 52
VI-2.Immunolocalisation ultrastructurale 54
V-2-1.Préparation des échantillons 54
VI-2-2.Immunolocalisation 54

RESULTATS 56

I-SELECTION DES SONDES ANTICORPS SPECIFIQUES DES ORGANITES DES ZOITES DE *TOXOPLASMA GONDII* 57

II-CARACTERISATION D'UNE PROTEINE DU CONOÏDE 58
II-1-Immunolocalisation 58
II-2-Immunoempreinte 58
II-3-Incorporation de précurseurs radiomarqués 59
II-4-Cinétique de biosynthèse de la protéine 59

III-CARACTERISATION DES PROTEINES DES MICRONEMES 60
III-1-Immunolocalisation 60
III-2-Immunoempreintes réalisées avec les sondes anti micronèmes 60
III-3-Incorporation des précurseurs radiomarqués 61
III-4-Cinétiques de biosynthèse des protéines 62

IV-CARACTERISATION DES PROTEINES DES GRANULES DENSES 63
IV-1-Immunolocalisation 63
IV-2-Immunoempreintes réalisées avec les sondes anti granules denses 63
IV-3-Incorporation des précurseurs radiomarqués 65
IV-4-Cinétiques de biosynthèse des protéines 65

V-PURIFICATION DES PROTEINES ET PRODUCTION DES SERUMS POLYCLONAUX 66
V-1-Purification de la protéine de 90 kDa des micronèmes 66
V-2-Purification de la protéine de 30 kDa des granules denses 67

VI-DEVENIR DU CONTENU DES ORGANITES DU COMPLEXE APICAL LORS DE L'INTERACTION TACHYZOÏTE-CELLULE HOTE 67
VI-1-Observations en microscopie électronique des stades précoces de l'invasion 67
VI-2-Localisation des protéines dans les cellules infestées 69
VI-2-1-Localisation des protéines des granules denses 69

VI-2-2-Localisation des protéines des micronèmes 70
VI-3-Affinité membranaire des protéines des micronèmes 71
VI-3-1-Révélation par immunofluorescence 71
VI-3-2-Révélation par immunoempreinte 71
VI-4-Modifications des protéines des micronèmes lors de l'invasion 72

DISCUSSION 74

I-CARACTERISATION D'UNE PROTEINE DU CONOIDE 75

II-CARACTERISATION DES MICRONEMES 76
II-1-Composition du contenu des micronèmes 77
II-2-Rôle des micronèmes dans l'interaction parasite-cellule hôte 81
II-3-Exocytose des micronèmes 85
II-4-Division des tachyzoïtes et formation des micronèmes 86

III-CARACTERISATION DES GRANULES DENSES 88
III-1-Contenu des granules denses 88
III-2-Exocytose des granules denses à la fin de l'invasion 92
III-3-Formation du réseau tubulo-membranaire de la vacuole parasitophore; destinée des différents constituants des granules denses 94
III-4-Vacuole parasitophore, rôle du réseau tubulo-membranaire et de la membrane de la vacuole parasitophore 96
VI-COMMUNAUTE ANTIGENIQUE ENTRE LES STADES TACHYZOITE ET BRADYZOITE 98

CONCLUSION 100

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 105

INTRODUCTION

Plusieurs maladies parasitaires, de grande importance clinique (humaine et vétérinaire) et économique, aussi diverses que le paludisme, la toxoplasmose, la coccidiose, la sarcosporidiose, sont provoquées par un groupe très homogène de protozoaires parasites intracellulaires. Ces organismes appartiennent au groupe des sporozoaires. Malgré de grandes différences dans les pathologies provoquées, les formes infectieuses de leurs germes, également appelés zoïtes, possèdent des organisations cellulaires très similaires et présentent des mécanismes analogues d'interaction avec les cellules hôtes.

Les zoïtes des sporozoaires contiennent en effet des organites particuliers, communs à toutes les espèces du groupe et qui constituent un complexe apical qui définit une polarité cellulaire antéro-postérieure, ce qui a valu au phylum le nom d'Apicomplexa. Les organites du complexe apical seraient impliqués dans les processus d'invasion et d'installation à l'intérieur des cellules hôtes, étapes cruciales pour le déroulement du cycle biologique. L'exocytose du contenu de ces organites, et la détection simultanée de certains de leurs constituants au niveau de différents compartiments des cellules hôtes ont été rapportées. Leur rôle dans les interactions entre les parasites et leurs cellules hôtes a été par ailleurs suggérée par des essais d'inhibition ou d'activation de ces interactions au moyen d'anticorps spécifiques.

Un domaine de recherche s'est orienté vers la caractérisation biochimique et l'étude de la fonction des différents composants de ces organites. L'identification des sites d'interaction entre le parasite et sa cellule hôte, ainsi que des molécules d'origine parasitaire impliquées dans ces phénomènes, pourrait aider à comprendre et à contrôler l'invasion et l'installation dans les cellules hôtes. Toute avancée dans cette caractérisation peut être alors exploitable dans les domaines du diagnostic, de la prévention et de la thérapeutique anti parasitaire.

Nous avons utilisé *Toxoplasma gondii* pour étudier l'interaction parasite–cellule hôte lors de l'invasion et de l'installation dans la vacuole parasitophore. *Toxoplasma gondii* est un modèle expérimental de choix pour les raisons suivantes: il se multiplie dans de nombreux types cellulaires *in vitro*, peut être obtenu en grande quantité, peut infester un grand nombre d'hôtes *in vivo*, et présente en outre un intérêt médical. Du fait de ses capacités d'interaction, il peut être un élément d'intérêt pour la recherche des facteurs communs dans les processus du parasitisme. Nous avons entrepris une caractérisation biochimique et un suivi du devenir de molécules des micronèmes et des granules denses. Cette étude a été réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux et polyclonaux produits contre des extraits de parasites ou de fractions purifiées d'organites, de protéines parasitaires ou recombinantes.

Nos résultats ont conduit à la première caractérisation du contenu des micronèmes, organites encore très énigmatiques, ainsi qu'à la mise en évidence d'une distribution différentielle des molécules des granules denses vers des compartiments différents de la vacuole parasitophore.

GENERALITES

I-TAXONOMIE DE *TOXOPLASMA GONDII*

Protozoaire, parasite intracellulaire obligatoire, en forme d'arc, *Toxoplasma gondii* fut décrit pour la première fois par Nicolle et Manceaux en 1908 chez le gondi (*Ctenodactylus gondi*), un petit rongeur sauvage du sud de la Tunisie. La première toxoplasmose humaine a été observée vers 1923, la transmission des formes infectieuses par le chat a été affirmée en 1965 par Hutchison alors que la première description du cycle, précis et complet, n'a été faite qu'en 1970, simultanément par Hutchison *et al.* et par Frenkel *et al.*

La position systématique de *Toxoplasma gondii* est d'après Levine *et al.* (1980):

Embranchement: *PROTOZOA* Goldfus, 1818

Phylum: *APICOMPLEXA* Levine, 1970

Classe: *SPOROZOEA* Leuckart, 1879

Sous-classe: *COCCIDIA* Leuckart, 1879

Ordre: *EUCOCCIDIIDA* Léger et Duboscq, 1910

Sous-ordre: *EIMERIINA* Léger, 1911

Famille: *SARCOCYSTIDAE* Poche, 1913

Sous-famille: *TOXOPLASMATINAE* Biocca, 1957

Genre: *TOXOPLASMA* Nicolle et Manceaux, 1909

Espèce: *GONDII*

II-CYCLE BIOLOGIQUE

(D'après Fenkel, 1988; schéma 1)

Au cours de leur cycle biologique, les sporozoaires passent par des stades successifs de développement où le mode de reproduction est soit asexué (sporogonie ou mérogonie) soit sexué (gamogonie).

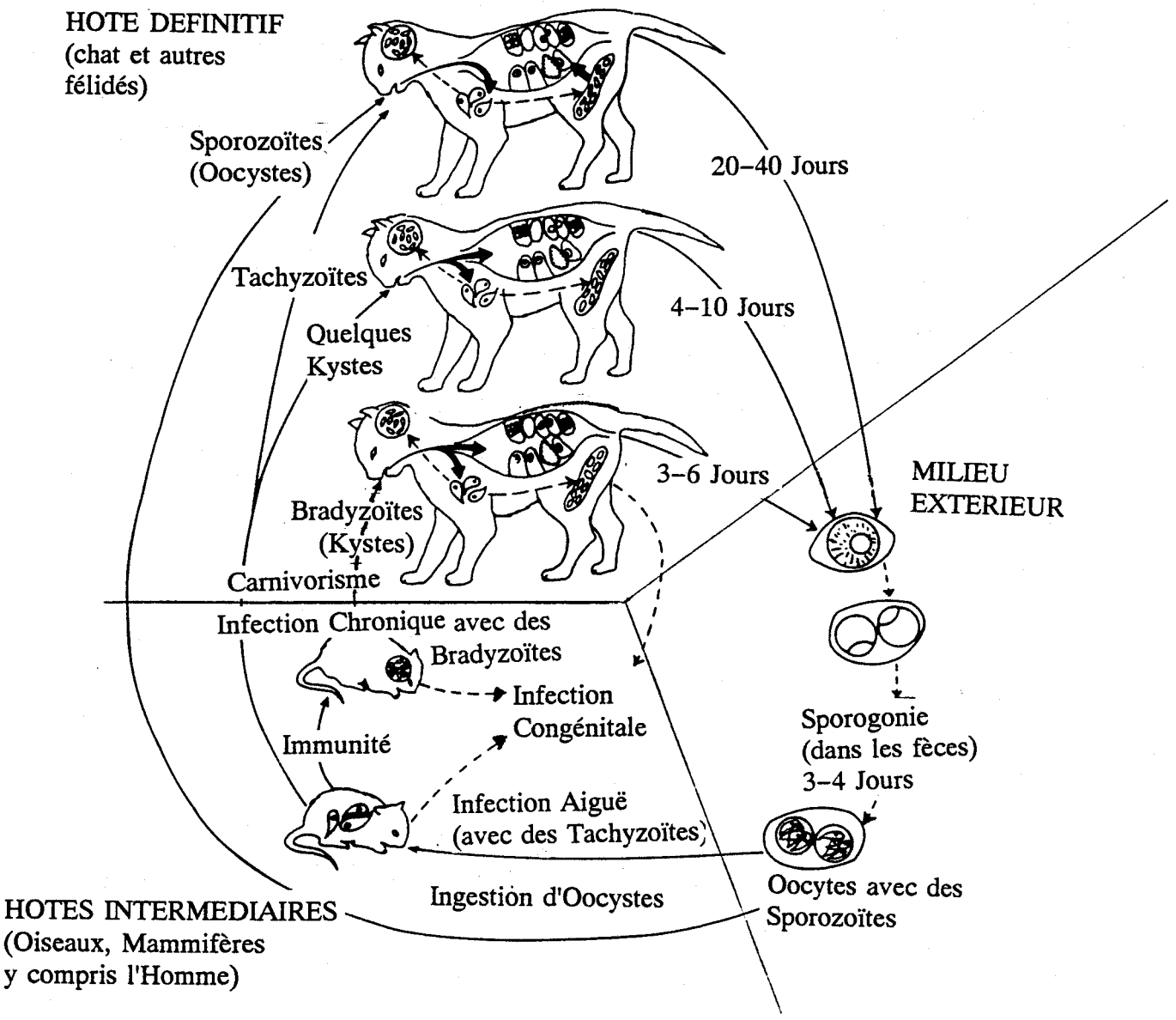


Schéma 1: Cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*
(D'après Frenkel, 1988)

Toxoplasma gondii possède un cycle hétéroxène dont l'hôte définitif, chez qui se déroule la multiplication sexuée, est un félidé, en particulier le chat. Les hôtes intermédiaires sont les vertébrés homéothermes, y compris l'homme. Certains invertébrés servent parfois d'hôte parathénique et assurent la survie des germes de *Toxoplasma gondii*. Les hôtes définitifs peuvent intégrer un cycle direct et complet sans passage obligatoire par des hôtes intermédiaires.

La gamogonie ou reproduction sexuée, se déroule dans les cellules de l'épithélium intestinal des félidés et produit des microgamètes flagellés et des macrogamètes immobiles. L'oocyste produit par la fécondation passe dans la lumière intestinale et s'élimine avec les fècés dans le milieu extérieur où il peut atteindre sa maturité.

La sporogonie se déroule sous certaines conditions d'humidité et de teneur en oxygène. Elle aboutit en trois à quatre jours à deux sporocystes contenant chacun quatre sporozoïtes.

Les sporozoïtes (libérés dans l'intestin après excystation de l'oocyste) évoluent en d'autres formes qui passent par des étapes de multiplications asexuées répétitives avant de reprendre la mérogonie et la multiplication sexuée. Ces étapes de multiplications végétatives supplémentaires se déroulent hors de l'intestin, dans le système réticulo-histiocytaire, les muscles, le cerveau... Elles peuvent se dérouler aussi bien chez les hôtes définitifs que chez les hôtes intermédiaires. Ces étapes comprennent une phase initiale proliférative, avec des tachyzoïtes à multiplication rapide par endodyogénie qui sont les formes de dissémination du parasite. Par la suite, pour des raisons non éclaircies, impliquant sans doute la réponse immune de l'hôte, des tachyzoïtes évoluent en bradyzoïtes, qui sont des germes à multiplication végétative très lente, regroupés dans des kystes. Ils constituent ainsi les formes de résistance en phase de latence, logés dans les tissus des organes à défense immunitaire réduite comme les muscles striés ou le muscle cardiaque et surtout le tissu nerveux. L'évolution des

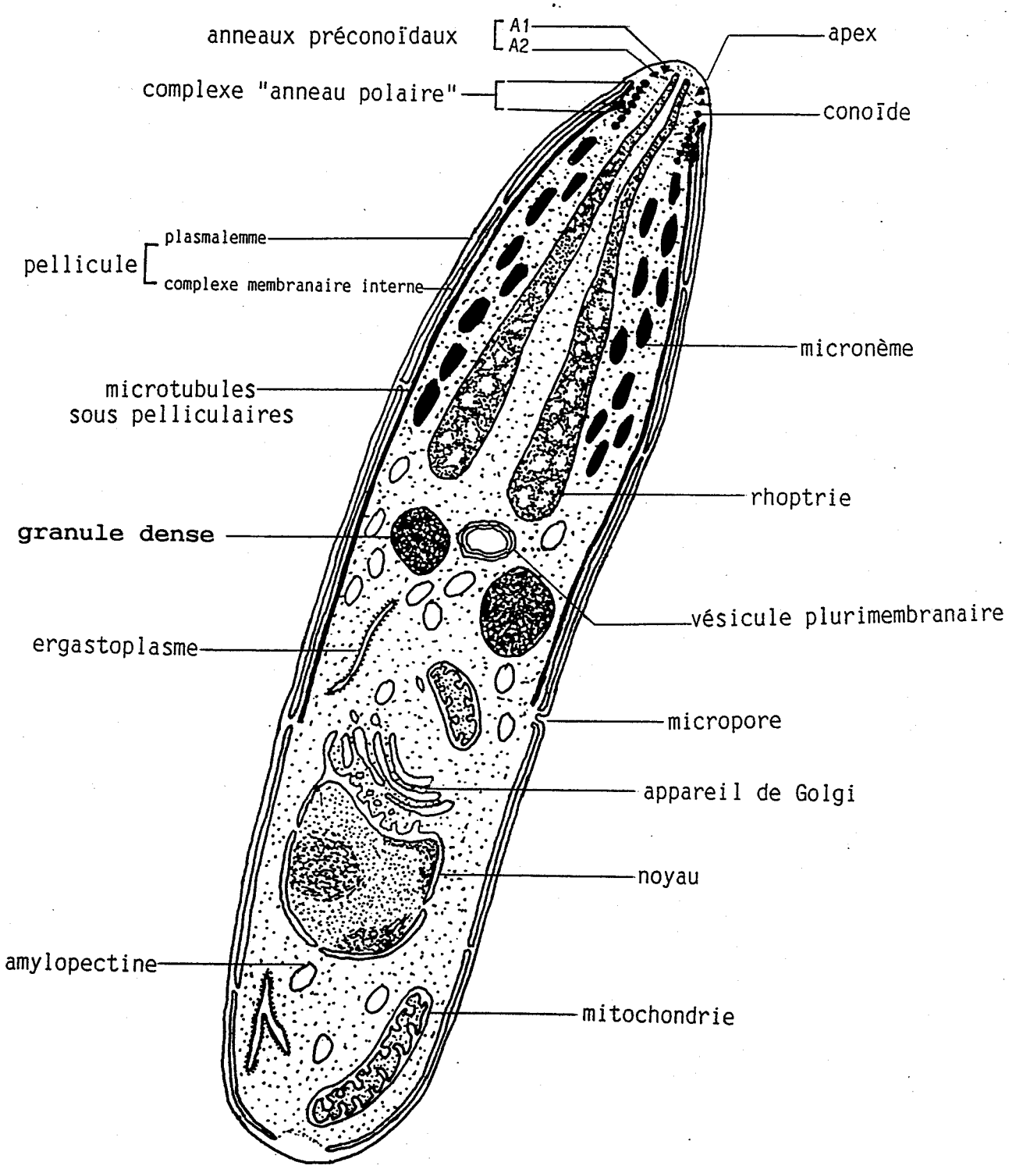


Schéma 2: Organisation ultrastructurale du zoïte des Sporozoaires.
(d'après Sadak, 1988)

bradyzoïtes en tachyzoïtes peut se produire après l'eclatement du kyste en cas d'une levée de la pression immune.

Cette partie du cycle indirect peut se reproduire de façon indéfinie chez les hôtes intermédiaires qui se contaminent soit par des tachyzoïtes en phase de dissémination rapide (cas de l'infection transplacentaire), soit par des bradyzoïtes (ingestion de viandes contenant des kystes).

La reprise de la reproduction sexuée, à partir des bradyzoïtes, ne se produit que chez les félidés, soit directement quand ils sont contaminés par des oocystes, soit indirectement par ingestion d'un hôte intermédiaire contaminé.

III-ORGANISATION ULTRASTRUCTURALE DE *TOXOPLASMA GONDII*

(Schéma 2)

La cellule du zoïte de *Toxoplasma gondii*, forme infectieuse des différents stades de développement: tachyzoïte, bradyzoïte ou sprozoïte, est de forme arquée, longue de 6 à 8 µm et large de 2 à 3 µm, avec une extrémité postérieure arrondie et une apicale plus effilée. Elle partage avec les zoïtes de tous les sporozoaires une organisation particulière caractéristique. La particularité de ce groupe de protozoaires réside dans la structure de leur paroi et la concentration d'organites spécifiques dans leur région apicale.

III-1-Inclusions cytoplasmiques

Au niveau du cytoplasme, on retrouve les inclusions classiques d'une cellule eucaryote: une abondance de ribosomes dans toute la masse cytoplasmique; un noyau sphérique dans la moitié postérieure de la cellule (chez les bradyzoïtes, il est quasiment à l'extrémité postérieure) avec un nucléole central et des plaques de chromatine appliquées contre l'enveloppe nucléaire de type classique. A l'avant du noyau, se trouve l'appareil de Golgi dont les saccules aplatis

et empilés dérivent soit de l'enveloppe nucléaire soit de l'ergastoplasme. L'ergastoplasme est peu abondant. On trouve également une mitochondrie à ramifications multiples et à crête en ampoules (Vivier et Petitprez, 1972). Les substances de réserve sont composées de globules lipidiques et de grains d'amylopectine essentiellement (Senaud, 1967), plus abondant chez les formes enkystées. On peut aussi rencontrer dans ce cytoplasme des vésicules à parois multiples décrites comme "vésicules plurimembranaires" et dont la fonction n'est pas connue.

III-2-La pellicule

La masse cytoplasmique est enveloppée par une paroi ou pellicule composée d'une membrane plasmique et d'un complexe membranaire interne. Le plasmalemme est une membrane de type classique sans "cell coat" développé. Une invagination circulaire latérale du plasmalemme constitue le micropore. Les études de cryofracture ont montré que les particules intramembranaires ont une répartition aléatoire mais constituent vers l'apex une rosette: " la rosette apicale" où 8 particules entourent une neuvième centrale (Porchet et Torpier, 1977; Dubremetz et Torpier, 1978). Le complexe membranaire interne double le plasmalemme sur la face cytoplasmique. Il peut disparaître au cours du développement des stades végétatifs de certaines espèces de coccidies. Ce complexe interne est une juxtaposition de vésicules aplaties (Vivier et Petitprez, 1969), arrangées en plaques longitudinales insérées sur une plaque unique tronc-conique dans la région apicale qui constitue la "cape apicale" (Porchet et Torpier, 1977; Dubremetz et Torpier, 1978). Toutes les plaques convergent vers l'extrémité postérieure. Ces plaques renferment des alignements longitudinaux de particules intramembranaires. Certaines rangées sont doubles et correspondent en disposition et en nombre aux microtubules sous-pelliculaires.

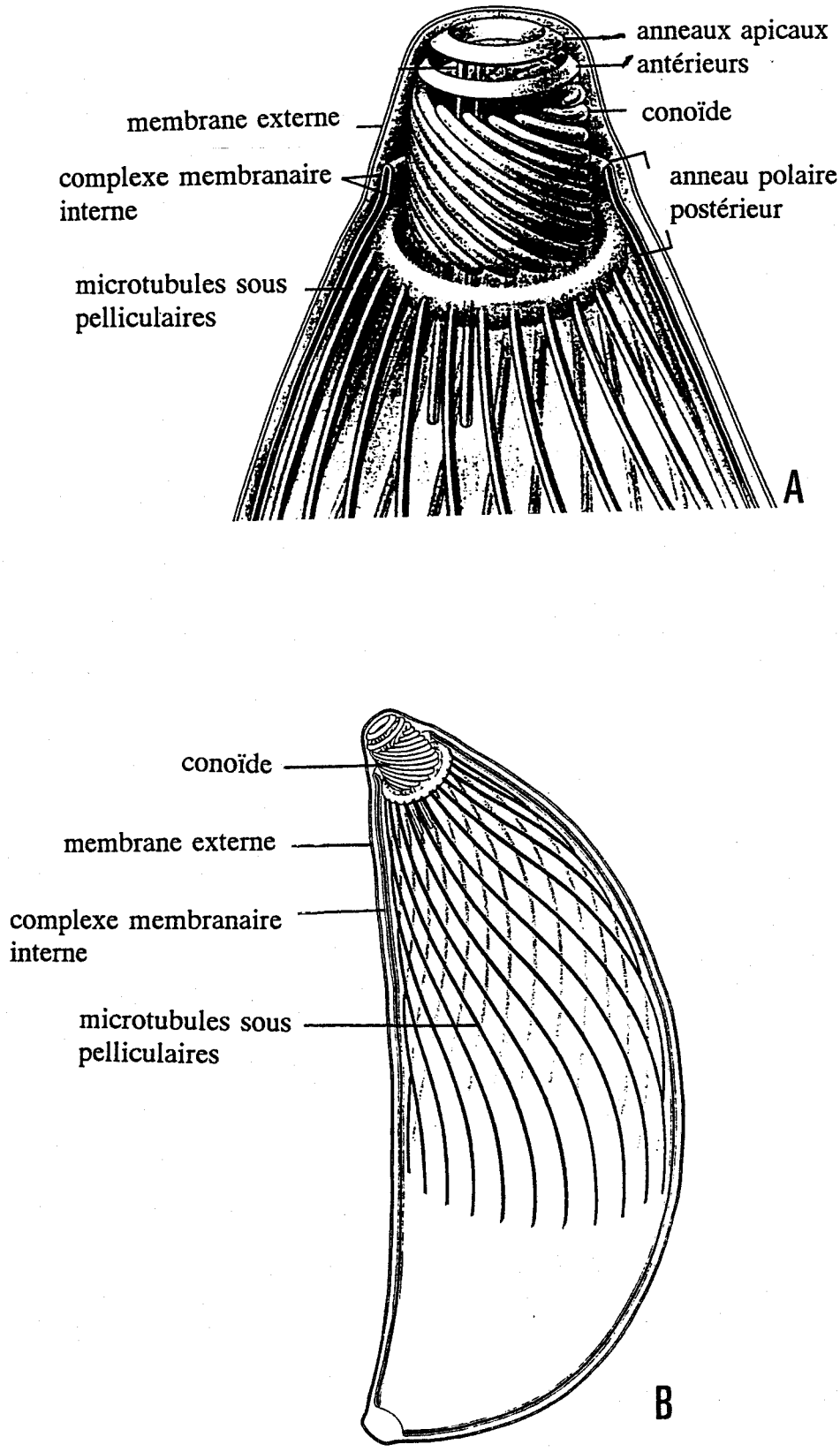


Schéma 3: Organisation du Conoïde (A) et du Système Microtubolaire chez *Toxoplasma gondii*.
(d'après Nichols et Chiappino, 1987)

III-3-Système microtubulaire

(Schéma 3B)

Un sytème de microtubules, en nombre de 22 chez *Toxoplasma gondii* (De Souza, 1974) est mis en évidence chez tous les stades mobiles des sporozoaires. Il jouerait un rôle dans la mobilité ou ferait partie du cytosquelette. Issus d'un anneau dense, situé à la base du conoïde, les microtubules parcourent longitudinalement la pellicule sur la face cytoplasmique jusqu'au tiers postérieur du zoïte.

III-4-Complexe apical

C'est l'ensemble des organites le plus caractéristique des Apicomplexa regroupés dans la région antérieure de toutes les formes infectieuses.

Sous le plasmalemme, au niveau de l'apex et juste en dessous de la rosette apicale, adhère une vésicule de 60 nm de diamètre centrant un grain dense: c'est "la vésicule apicale" (Porchet-Hennere et Nicolas, 1983). On rencontre en dessous deux anneaux denses qui surmontent le conoïde: "anneaux préconoïdaux". Le conoïde (schéma 3A), structure absente chez les hémosporidies, est un assemblage de structures fibrilaires agencées en spirales, enroulées dans le sens des aiguilles d'une montre, et décrivant un tronc de cône qui surmonte l'anneau dense d'où partent les microtubules sous-pelliculaires (Aikawa et Sterling, 1974; De Souza, 1974).

Les rhoptries (Senaud, 1967) d'abord nommées "toxonèmes" par Gustafson *et al.* (1954) ou "paired organelles" par Garnham (1960) sont des organites en forme de massues allongées logées dans le tiers antérieur de la cellule, entourées par une membrane unitaire. La partie distale renflée a un aspect spongieux et contient du matériel dense entremêlé à une matrice claire. Le col ou pédoncule, dense aux électrons est effilé, il s'insinue dans le conoïde. Leur formation se ferait à partir du dictyosome (Porchet et Vivier, 1971). Le nombre de ces

organites est variable selon les différentes espèces d'Apicomplexa, il en existe une dizaine chez les zoïtes de *Toxoplasma gondii*.

Les granules denses ou "microsphères" sont des organites globuleux entourés par une membrane unitaire. Ils ont été longtemps confondus avec les rhoptries. Ils se distinguent des sections de la partie en bulbe des rhoptries par leur aspect plus homogène et plus dense aux électrons (Vivier et Petitprez, 1972). Ils sont répartis dans le cytoplasme de part et d'autre du noyau.

Les micronèmes (Gustafson *et al.*, 1954; Jacobs, 1967) sont le troisième type d'organites denses aux électrons limités par une membrane unitaire. Leur taille est plus petite que celle des rhoptries et des granules denses. Ils sont parfois confondus avec les sections des pédoncules des rhoptries. Vivier et Petitprez (1972) les avaient considerés comme précurseurs des rhoptries et Heller et Scholtyseck (1971) avaient suggéré l'existence de canalicules entre les micronèmes et les rhoptries. Ils sont logés dans le tiers ou toute la moitié antérieure du zoïte. Leur abondance est variable selon les espèces d'Apicomplexa et selon les différents stades du développement pour une même espèce. Chez *Toxoplasma gondii*, ils sont plus nombreux au stade bradyzoïte qu'au stade tachyzoïte.

IV-TOXOPLASMOSE

Toxoplasma gondii est l'agent responsable de la toxoplasmose. L'homme et les animaux domestiques sont contaminés par l'une des formes de dissémination issue de multiplication sexuée ou végétative. La contamination se fait par voie orale en consommant des végétaux souillés par des oocystes mûrs contenant des sporozoïtes, par ingestion de viande contenant des kystes qui vont libérer des bradyzoïtes, ou par contact direct avec le chat. Dans le cas d'une toxoplasmose congénitale, la contamination se fait par voie transplacentaire: des

tachyzoïtes se transmettent au foetus au cours de la grossesse pendant la phase d'infection aiguë de la mère.

L'infestation par le toxoplasme déclenche une réponse immunitaire aussi bien humorale que cellulaire qui protège contre une réinfection chez l'individu immun.

Dans la cinétique de la réponse humorale, les molécules de surface de la cellule de *Toxoplasma gondii* seraient les premières à induire l'apparition d'anticorps anti-toxoplasme de la classe d'immunoglobulines des IgM puis des IgA (Sharma *et al.*, 1983, Decoster *et al.*, 1988; Godard *et al.*, 1990). Ces classes disparaissent au bout de quelques mois après une primo-infection. L'apparition précoce des IgE est également signalée (Godard *et al.*, 1990). Ensuite, on voit apparaître puis augmenter en taux des IgG dirigées contre divers composants parasitaires avec un maximum de concentration vers le quatrième mois avant une diminution progressive et beaucoup plus tardive que pour les autres classes d'immunoglobulines. Cette classe d'immunoglobulines est la seule à réaugmenter en concentration en cas de nouvelle infection ou de réactivation de foyers d'infection latente.

Le rôle protecteur des anticorps anti-toxoplasme est démontré chez des modèles expérimentaux naturellement sensibles à une infection par *Toxoplasma gondii*, et qui deviennent résistants après transfert d'anticorps à partir d'individus immuns de souches résistantes (Johnson *et al.*, 1983; Darcy *et al.*, 1988).

Une large part de la défense immune contre les toxoplasmes semble être à médiation cellulaire. Plusieurs types cellulaires sont impliqués et peuvent intervenir dans la réaction immunitaire.

Lors de la phase aiguë de l'infestation par *Toxoplasma gondii*, une part de la protection est assurée par les lymphocytes dont le nombre augmente sensiblement, surtout les

lymphocytes de la sous-classe CD8 (cellules suppressives) (Derouin, *et al.*, 1989). Leur rôle dans la protection est vérifié après déplétion à l'aide d'anticorps spécifiques (Araujo, 1991). Parker *et al.* (1991) ont déterminé leur rôle protecteur après des transferts chez des souris sensibles. Ils ont constaté que la sous-classe CD8 assurent une protection plus importante que celle des CD4. D'autre part, les lymphocytes des sujets en phase chronique sont stimulables par des antigènes de toxoplasme (Johnson, 1981; Hugues *et al.*, 1984; Derouin *et al.*, 1989).

Les macrophages assurent en grande partie l'élimination des germes infectieux. Prélevés chez les sujets non immuns, ils ne sont pas cytotoxiques envers les toxoplasmes qui peuvent s'y développer sans être attaqués par les systèmes lysosomaux. Par contre, les macrophages de sujets en phase chronique, ou des macrophages activés par des lymphokines (Interféron gamma, TNF, IL2, IL6) ou des anticorps anti-toxoplasme, expriment une action cytotoxique envers les parasites qu'ils phagocytent (Sethi *et al.*, 1981; Sibley *et al.*, 1985a; Mellors *et al.*, 1989).

Les effets cytotoxiques amplifiables par des anticorps ou des lymphokines sont aussi reconnus pour les cellules LAK (Dannemann *et al.*, 1989) et pour les cellules myéloïdes (Erbe *et al.*, 1991). Les plaquettes sanguines sont signalées comme intervenant également dans la protection immunitaire (Yong *et al.*, 1991).

Dans le cas général, la toxoplasmose est une maladie bénigne et asymptomatique. Cependant, en cas d'immunodépression suite à une greffe d'organe ou chez les personnes atteintes du SIDA, la maladie devient grave voire fatale. La réactivation de foyers d'infection latente après immunodépression, engendrent des toxoplasmoses cérébrales se manifestant par des encéphalites et des abcès cérébraux ou des cas de toxoplasmose pulmonaire. La contamination congénitale peut être également de conséquences graves. La prolifération massive des tachyzoïtes transmis au foetus qui n'a pas encore acquis une immunité propre peut

provoquer soit des avortements, soit se manifester plus tard par des choriorétinites ou des complications cérébrales.

Le dépistage de la toxoplasmose peut s'avérer très important surtout au cours de la gestation. Le diagnostic biologique consiste à mettre en évidence l'existence, dans le sérum, d'anticorps spécifiques en les faisant réagir sur des antigènes fractionnés ou entiers de toxoplasme selon le type de test utilisé (réaction de fixation de complément; Dye–test; immunofluorescence indirecte; ...).

Les conséquences cliniques et économiques de la toxoplasmose sont donc d'une grande importance. La médecine vétérinaire porte un intérêt particulier à ces infections toxoplasmiques à cause des pertes non négligeables occasionnées dans les élevages par les avortements chez les ovins et les bovins. La maladie peut toucher la quasi–totalité des animaux d'élevage et domestiques.

V–INTERACTION APICOMPLEXA–CELLULE HOTE

Les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* peuvent survivre plusieurs heures en milieu acellulaire mais leur division n'a jamais été rapportée dans ces conditions. Le passage en milieu extracellulaire ne doit être qu'une étape transitoire lors de la prolifération du parasite pour assurer sa dissémination, comme c'est le cas des germes infectieux de toutes les espèces d'Apicomplexa qui sont tous des parasites intracellulaires obligatoires.

En milieu extracellulaire, plusieurs paramètres vont conditionner la survie des zoïtes: d'une part, la possibilité d'échapper aux facteurs de la réaction immune que développe l'organisme hôte sujet au parasitisme, et d'autre part, la probabilité de retrouver d'autres cellules adaptées aux exigences de leur développement. Cette survie dépend aussi de la

capacité des zoïtes à envahir les cellules cibles, puis de leur faculté à supporter ou à détourner les réactions défensives des cellules hôtes.

En ce qui concerne la pénétration, l'invasion d'une cellule par un parasite peut résulter de différents processus:

– par microperforation, opérée au niveau du plasmalemme, c'est la stratégie utilisée par les microsporidies,

– par phagocytose, où le parasite est activement internalisé par la cellule dans une invagination du plasmalemme qui devient une vacuole appelée phagosome, c'est le cas de *Trypanosoma cruzi* ou de *Leishmania*,

– par invasion active: ensemble de processus induits et controlés par le parasite, conduisant à la modification et l'invagination d'une partie du plasmalemme de la cellule envahie, puis son détachement dans le cytoplasme, l'isolant ainsi du reste de la cellule. Cette stratégie est celle utilisée par les sporozoaires.

En ce qui concerne le développement intracellulaire, la survie puis la prolifération d'un organisme traduisent l'existence de conditions favorables et d'un équilibre avec l'environnement où il se trouve. Les échanges qu'il effectue sont à son profit; l'espace, l'apport nutritif et la protection des substances toxiques doivent lui être assurés. Pour un parasite intracellulaire obligatoire, la formation du compartiment dans la cellule hôte ne doit pas altérer la machinerie du métabolisme cellulaire dont il est tributaire, mais doit en même temps répondre aux exigences de son développement.

Les similitudes dans les structures et les comportements des différentes espèces d'Apicomplexa lors de l'invasion, font que les données des études sur chacune des espèces ont souvent pu être étendues aux autres modèles. Ainsi, d'après les données recueillies jusque là, quelques caractéristiques de l'interaction Sporozoaire–cellule hôte ont été établies.

Premièrement: l'internalisation des germes infectieux s'effectue selon un processus d'invasion active, c'est-à-dire que cette invasion est induite et contrôlée par le parasite pour gagner l'intérieur de la cellule hôte. Cette invasion active peut être subdivisée en plusieurs étapes depuis la reconnaissance entre le parasite et la cellule hôte jusqu'à l'internalisation complète et l'installation du parasite dans une vacuole parasitophore pour commencer sa multiplication.

Deuxièmement: la vacuole parasitophore, compartiment isolant le parasite du reste de la cellule hôte, serait élaborée par le parasite lui-même et ne dériverait pas d'une simple invagination du plasmalemme.

Troisièmement: certains organites apicaux du parasites (rhoptries, micronèmes, granules denses) sont impliqués dans ces phénomènes, en particulier par l'exocytose de leur contenu.

Toutefois, aucune de ces trois propositions n'a reçu encore de démonstration définitive, et de nombreuses investigations seront nécessaires pour comprendre le mécanisme d'invasion.

V-1-Différentes étapes de l'invasion

Le germe infectieux des sporozoaires entre en contact avec la cellule cible par une partie quelconque de sa surface. Il se réoriente ensuite et présente la partie apicale en face de l'endroit où la pénétration va se produire. Il se forme alors une petite dépression de la membrane plasmique de la cellule hôte qui se transforme en une calotte sphérique, puis en un anneau faisant jonction avec le parasite. Cet anneau ou jonction mobile coulisse le long du parasite vers le pôle postérieur au cours de sa pénétration. Il redevient une calotte sphérique postérieure puis la membrane entourant le parasite se pince et se détache du plasmalemme l'isolant dans le cytoplasme de la cellule hôte. La nouvelle vacuole parasitophore ainsi formée s'agrandit ensuite pour permettre le développement du parasite.

La description en détail de l'invasion a été faite pour la première fois chez *Plasmodium* (Ladda *et al.*, 1969). Chez *Toxoplasma gondii*, la première description a été faite par Jones *et al.* (1972).

V-1-1-Reconnaissance et attachement

V-1-1-1-Description

Chez les hémosporidies qui n'envahissent et ne se développent que dans des hématies d'hôtes bien particuliers, la reconnaissance et l'attachement peuvent s'effectuer par n'importe quelle partie de la cellule du parasite (Dvorak *et al.*, 1975), à la différence de la pénétration qui débute toujours par l'extrémité apicale (Aikawa *et al.*, 1977; 1978).

Sur le plan moléculaire, la notion de reconnaissance est concrétisée par l'identification de déterminants membranaires sur certaines cellules hôtes et l'existence de récepteurs complémentaires sur la surface des parasites. Les mérozoïtes de *Plasmodium vivax* et *Plasmodium knowlesi* utiliseraient les protéines du groupe Duffy du globule rouge pour s'y attacher (Miller *et al.*, 1975; Barnwell *et al.*, 1989b). Des récepteurs spécifiques pour ces glycoprotéines sont identifiés à la surface des parasites ou dans le milieu extracellulaire après leur libération à partir des micronèmes (Haynes *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1988; Adams *et al.*, 1990). Le mérozoïte de *Plasmodium falciparum*, s'attacherait au globule rouge humain, essentiellement au niveau des molécules de glycophorines A et B, grâce à des protéines libérées dans le milieu extérieur telle que l'EBA175 (Camus et Hadley, 1985; Perkins et Rocco, 1988; Sim *et al.*, 1990; Orlandi *et al.*, 1990). L'identification des molécules cibles à la surface du globule rouge a été réalisée soit d'après la résistance à l'invasion des cellules qui en sont déficientes (Perkins, 1981, Pasvol *et al.*, 1982); soit d'après des inhibitions d'invasion à l'aide d'anticorps dirigés contre elles (Facer, 1984, Holt *et al.*, 1989, Barnwell *et al.*, 1989a), soit par des essais de compétition avec des molécules comparables (Deas et Lee, 1981; Perkins, 1984).

Chez les coccidies des genres *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*..., la notion de reconnaissance est moins claire étant donnée leur capacité à interagir avec plusieurs types cellulaires. Ces espèces d'Apicomplexa à large spectre d'interaction utiliseraient peut-être des déterminants plus largement répandus que ceux exigés par les hémosporidies. Récemment, Joiner *et al.* (1989) ont montré que la laminine (composante de la matrice extracellulaire) est impliquée dans l'augmentation de l'attachement et de l'infectivité des Toxoplasmes. Deux antigènes de 60-67 et 14-16 kDa, composants mineurs de la surface de *Toxoplasma gondii*, seraient les récepteurs pour la laminine.

A la dissymétrie morphologique antéro-postérieure des zoïtes des sporozoaires, se superpose une dissymétrie de la répartition des antigènes au niveau de la pellicule. A l'apex des zoïtes se trouvent des antigènes non localisés ailleurs et dont certains ont des domaines très conservés chez plusieurs espèces d'Apicomplexa (Sadak, 1988, Taylor *et al.*, 1990). L'emplacement particulier de tels antigènes (exemple de l'antigène apical de 66 kDa chez *Plasmodium knowlesi*; Thomas *et al.*, 1990), doit être en relation directe avec les phénomènes d'attachement et de l'orientation de la région apicale face à la membrane plasmique de la cellule cible.

V-1-1-2-Implication des organites du complexe apical dans le phénomène d'attachement

La disposition particulière des organites du complexe apical est vraisemblablement liée à leur implication dans les différentes étapes de l'interaction avec la cellule hôte. Leur rôle secrétoire a pu être montré de manière directe sur certaines images, ou de manière indirecte après la localisation de certains de leur constituants hors des parasites ou dans les cellules hôtes.

Le RESA ou Pf155 (protéines de *Plasmodium falciparum* localisées au niveau des hématies infectées au stade anneau; Perlmann *et al.*, 1984; Coppel *et al.*, 1984) a d'abord été localisé au niveau des micronèmes par Brown *et al.* (1985) puis au niveau du complexe micronèmes-rhoptries par Uni *et al.* (1987). Il était supposé excrété lors de l'invasion. Des études plus récentes (Aikawa *et al.* 1990, Culvenor *et al.* 1991) ont montré que cette molécule n'est pas impliquée dans ces étapes d'invasion. En effet, ces études ont montré qu'elle était localisée dans les granules denses, exocytée dans la vacuole parasitophore après invasion et acheminée ensuite au niveau de la membrane de l'érythrocyte.

L'EBA175 a été localisé par immunofluorescence indirecte, grâce à des anticorps dirigés contre une de ses séquences peptidiques, au niveau des organites de la région apicale des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* d'où il serait libéré pour permettre l'attachement des mérozoïtes aux globules rouges (Sim *et al.*, 1990).

Les informations les plus précises concernent les micronèmes de *Plasmodium knowlesi* qui renfermeraient les récepteurs des antigènes Duffy, et qui ont été décrits comme jouant un rôle dans l'attachement de ce parasite (Adams *et al.*, 1990). Chez *Plasmodium brasilianum* (Torii *et al.* ,1989a) et chez *Sarcocystis muris* (Entzeroth *et al.*, 1991), d'autres molécules des micronèmes ont été localisées au niveau des membranes plasmiques des cellules hôtes après l'invasion. D'après ces auteurs, elles se seraient fixées au moment de l'invasion.

Les rhoptries des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* contiendraient des récepteurs autres que ceux qui se lient aux glycophorines de la surface des globules rouges (Sam-Yellowe *et al.*, 1988; 1990). Ces protéines se fixent sur les globules rouges des souris, et seraient donc responsables des possibilités d'attachement et d'invasion de certains isolats de *Plasmodium falciparum* observées dans de telles hématies (Klotz *et al.*, 1987). Des protéines de rhoptries de *Plasmodium falciparum* ont été localisées également au niveau de la membrane des globules rouges après invasion (Sam-Yellowe *et al.*, 1988).

La localisation de ces molécules au niveau des membranes des cellules hôtes après l'invasion fait supposer un rôle dans le processus de reconnaissance et d'attachement, d'autant plus que pour certaines, les anticorps spécifiques qu'elles peuvent engendrer entrainent une inhibition de l'invasion ou une certaine protection. Le rôle exact de toutes ces molécules n'est pas élucidé. Les données receuillies jusque-là peuvent aussi suggérer un rôle dans des étapes de l'invasion ultérieures au processus de reconnaissance et d'attachement.

Carvalho *et al.* (1991) détectent des sites de fixation de certaines lectines dans les rhoptries mais pas sur la surface de *Toxoplasma gondii*. Ils postulent alors que les molécules qui renferment ces sites sont excrétées des rhoptries dans le milieu exterieur pour permettre la reconnaisance et l'attachement du zoïte à la cellule cible et par ailleurs, permettre son invasion.

V-1-2-Formation de la jonction mobile et progression du parasite à l'intérieur de la cellule hôte

V-1-2-1-Description

L'attachement du zoïte, par son pôle apical sur la surface de la cellule hôte, est la première étape d'une série de réactions qui vont mener à son internalisation. Au niveau de la dépression engendrée par le contact, un épaississement du feuillet interne de la membrane plasmique de la cellule hôte est observé lors de l'invasion de plusieurs espèces d'Apicomplexa; *Plasmodium knowlesi* (Aikawa *et al.*, 1978); *Toxoplasma* (Michel *et al.*, 1979; Dubremetz, 1981; Porchet-Hennere, 1983); *Sarcocystis* (Dubremetz, 1981; Entzeroth, 1985). Le processus conduisant à cet épaississement est inconnu. La transformation de cet épaississement en un anneau formant la jonction mobile, qui va coulisser le long du parasite au cours de sa pénétration reste également inexpliquée.

D'après les données de cryofracture (Aikawa *et al.*, 1981; Entzeroth et Chobotar, 1989) on peut noter une déplétion des particules intramembranaires de la vacuole parasitophore en formation par rapport au plasmalemme de la cellule hôte avec lequel elle est encore en continuité au cours de la progression du parasite à l'interieur de la cellule hôte. Des données d'immunolocalisation (Dluzewski *et al.*, 1989) ont montré des résultats similaires. En observant cette déplétion en protéines, certains ont conclu à une action protéasique. Des protéases excrétées par le parasite cliveraient les protéines (en particulier cytosquelettiques) au niveau de la jonction, la bicouche lipidique pouvant s'étendre alors sous la pression du parasite qui avance vers l'intérieur de la cellule hôte (revue par Bannister et Dluzewski, 1990). Chez *Eimeria vermiformis* (Adams et Bushell, 1988) et *Eimeria tenella* (Fuller et McDougald; 1990), des activités protéasiques ont été corrélées avec les processus d'invasion. Chez *Toxoplasma gondii*, le PEF (penetration enhancing factor) (Lycke et Norrby, 1966; Norrby, 1970; Lycke *et al.*, 1975; Schwartzman, 1986; Schwartzman et Krug, 1989), extrait du lysat de tachyzoïtes et qui augmente leur infectivité *in vitro*, est supposé être aussi une enzyme de type protéase ou phospholipase agissant à ce stade de l'invasion.

D'autres auteurs, comme Saffer *et al.* (1989), postulent que des phospholipases (PLA2) auraient un rôle à jouer dans le processus d'invasion des germes infectieux, en agissant sur la fluidité membranaire de la cellule hôte. La variation de la fluidité membranaire, provoquée par des variations dans les rapports de concentrations de certains ions dans le milieu d'incubation comme le Ca^{++} (Tanabe *et al.*, 1980) ou par certains anesthésiques comme la lidocaïne (Werk, 1985), a été montrée comme influençant les taux d'infectivité des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Dans ces derniers cas cependant, les modifications de la motilité des parasites pourraient également expliquer les résultats obtenus.

V-1-2-2-Rôles des organites du complexe apical dans l'étape de pénétration

A ce stade de l'invasion, plusieurs changements évidents sont observés dans les organites du complexe apical, dont les principaux sont la raréfaction ou la disparition des micronèmes (Bannister, 1977) et les modifications ou la complète disparition des rhoptries à la fin de l'invasion (Bannister *et al.* 1975, Jensen et Edgar, 1976, Porchet-Hennere et Nicolas 1983; Nichols *et al.*, 1983). Les images du déversement du contenu de ces derniers organites peuvent servir d'argument aussi bien pour des hypothèses enzymatiques, que pour celles qui postulent que la membrane, en formation au cours de l'invasion du parasite, est formée soit *de novo* et intégralement par des substances d'origine parasitaire, soit au moins en partie par une contribution du parasite dont les substances excrétées vont s'intégrer à la membrane de la vacuole au cours de sa progression vers l'intérieur de la cellule hôte.

Plusieurs éléments et données expérimentales sont en faveur de la fonction sécrétoire des rhoptries. Une ouverture des rhoptries vers l'extérieur du zoïte a été décrite chez certaines espèces (Jensen et Edgar, 1976; Nichols *et al.*, 1983). La cryofracture a permis de montrer une disposition particulière de particules intramembranaires, au niveau de l'apex des zoïtes, définissant une rosette qui rappelle le site d'ancrage membranaire des extrusomes d'autres protozoaires (Porchet et Torpier, 1977; Dubremetz et Torpier, 1978; Dubremetz *et al.*, 1979). La calmoduline, qui joue un rôle dans les phénomènes d'exocytose chez les protozoaires, a été localisée au niveau de l'extrémité apicale des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* (Matsumoto *et al.*, 1987) et de *Toxoplasma gondii* et *Sarcocystis muris* (J-F. Dubremetz, communication personnelle).

D'autre part, la composition du contenu de ces organites apicaux est de plus en plus étudiée grâce à des sondes mono- ou polyclonales, et de plus en plus à des fractionnement cellulaires. C'est surtout la composition peptidique qui est explorée. Actuellement, plusieurs

protéines sont connues chez diverses espèces, dont certaines se regroupent en familles ou en complexes spécifiques de ces organites. Certaines de ces protéines ont été localisées sur la membrane de la vacuole parasitophore après l'invasion (Kimata et Tanabe, 1987; Leriche, 1989; Saffer *et al.*, sous presse). Ces observations constituent un élément en faveur de la contribution du parasite dans la formation de sa vacuole. Le PEF qui aurait une activité enzymatique chez *Toxoplasma gondii*, a été localisé au niveau des rhoptries (Schwartzman, 1986; Leriche, 1989).

Ces organites contiennent également des lipides. Bannister *et al.* (1977) ont déduit leur existence dans les rhoptries et les micronèmes d'après les différences d'aspects après traitements visant à extraire les substances lipidiques. Les réactions à l'acide tannique utilisé comme additif aux fixateurs, fait apparaître des structures multilamellaires (figures myéliniques identiques à celles produites par des phospholipides: phosphatidyl choline et sphingomeline) (Stewart et al; 1985; Bannister *et al.*, 1986). Après marquage métabolique à l'aide de précurseurs lipidiques radiomarqués ou fluorescents, Mikkelsen *et al.* (1988) ont détecté un marquage des rhoptries de *Plasmodium falciparum*. Dernièrement, Foussard *et al.* (1991) ont analysé la composition lipidique de la fraction de rhoptries purifiées de *Toxoplasma gondii*, ils en ont conclu que le contenu des rhoptries est compatible avec la génération d'une membrane. Le comportement dans un milieu aqueux des différents constituants de ces organites pourrait se traduire par la formation de liposomes capables de s'incorporer dans la membrane de la cellule hôte (Bannister *et al.*, 1977). Il a par ailleurs été calculé, après conversion en équivalent de surface, que les organites d'un parasite contiennent assez de matériel pour générer la totalité de la surface de la vacuole parasitophore (Bannister et Mitchell, 1989).

V-1-3-Motilité des parasites et invasion

Les inhibiteurs de la motilité des zoïtes sont également inhibiteurs de l'invasion. Les basses températures et des substances comme les cytochalasines B et D (Ryning et Remington, 1978; Miller *et al.*, 1979; Schwartzman et Pfefferkorn, 1983), inhibent la motilité et bloquent l'invasion (au stade de la formation de la jonction mobile chez *Plasmodium*). L'implication des filaments de myosine et d'actine paraît donc vraisemblable. En effet, ces molécules ont été localisées dans la région apicale de *Toxoplasma gondii* (Schwartzman et Pfefferkorn, 1983; Endo *et al.*, 1988, Yasuda *et al.*, 1988). Endo et Yagita (1990) ont démontré les effets inhibiteurs de certains ions administrés dans le milieu d'incubation sur la motilité des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Il ont conclu que la réduction du taux d'invasion constatée était due à l'immobilité des parasites et mettent ainsi en évidence l'importance de la motilité dans le processus d'invasion.

D'autre part, l'orientation de la pénétration du zoïte dans la cellule hôte coïncide avec celle définie pour ses mouvements. Les observations faites sur des zoïtes, libres en milieu extracellulaire, ont révélé une polarité antéro-postérieure des glissements (Russell et Sinden, 1981). Une autre observation avait évoqué le sens pôle antérieur-pôle postérieur pour ce déplacement, connue sous le nom de "capping" (King, 1988): il s'agit de la concentration à l'extrémité postérieure de composés recouvrant initialement toute la surface externe des zoïtes comme la ferritine cationisée (Dubremetz et Ferreira, 1978; Russell et Sinden, 1981; Russell, 1983), ou des anticorps (Dzbenski et Zielinska, 1976; Dzbenski *et al.*, 1976; Cochrane *et al.*, 1976, Tomavo *et al.*, 1989a).

Si l'on rapporte ces observations avec celles effectuées lors de l'invasion, on peut être amené à penser que lors de l'invasion, le parasite se propulse vers l'intérieur de la cellule par glissement sur les parois que forme la jonction mobile. L'accumulation au niveau des sites d'invasion des vésicules formées à partir des constituants du revêtement des zoïtes (Ladda *et*

al., 1969, Aikawa *et al.*, 1978) ou des anticorps dirigés contre des constituants membranaires comme la P30 de la surface de *Toxoplasma gondii* (Dubremetz *et al.*, 1985) renforcent cette hypothèse.

V-2-Installation du parasite dans la vacuole parasitophore

Le germe infectieux des sporozoaires est retrouvé à la fin de l'invasion dans une enveloppe membranaire, l'isolant du reste du cytoplasme de la cellule envahie, et qui constitue la membrane de la vacuole parasitophore. La cellule envahie continue à vivre et sa machinerie cellulaire ne semble pas être altérée après de multiples divisions du parasite ou même après formation de kystes (Ferguson et Hutchison, 1987, Dardé *et al.*, 1989). Chez *Plasmodium*, le cycle érythrocytaire débute à ce stade par la forme en anneau qui évolue en suite en trophozoïte. Chez *Toxoplasma gondii*, les divisions cellulaires par endodyogénie se déclenchent. Chez *Sarcocystis*, une deuxième vacuole parasitophore se forme quelques minutes après la fin de l'invasion, là où le parasite va continuer son développement. L'interaction avec la cellule hôte se traduit dans certains cas par l'apposition de réticulum endoplasmique et de mitochondries de la cellule hôte contre la paroi de la vacuole parasitophore. Chez *Toxoplasma gondii*, on note aussi la formation dès les premières minutes d'invasion d'un réseau tubulo-membranaire dans la vacuole. L'évolution de la vacuole parasitophore en kystes renfermant des bradyzoïtes au lieu de tachyzoïtes, s'accompagne de la disparition des mitochondries et du réticulum endoplasmique de la cellule hôte qui entourent la vacuole parasitophore, puis l'accumulation progressive de materiel dense aux électrons et de structures tubulaires sur la face interne de la membrane de la vacuole parasitophore formant ainsi la paroi kystique (Ferguson et Hutchison, 1987).

Le phénomène majeur du début de l'installation, est l'expansion de la vacuole parasitophore. Les excrétions parasitaires doivent provoquer l'agrandissement de l'espace

vacuolaire, soit par un effet mécanique soit par l'incorporation de certains composés dans la membrane vacuolaire. Des images de microscopie électronique de ce stade d'interaction chez *Plasmodium knowlesi* (Bannister *et al.*, 1975) et chez *Sarcocystis muris* (Entzeroth, 1985) montrent l'accolement des granules denses à la membrane plasmique du parasite puis leur fusion et l'excrétion de leur contenu. L'exocytose des granules denses a été démontrée plus tard par immunolocalisation à l'aide d'anticorps spécifiques chez *Sarcocystis muris* (Entzeroth *et al.*, 1986), et chez *Plasmodium knowlesi* (Torii *et al.*, 1989b). D'autre part, Entzeroth et Chobotar (1989) ont signalé une augmentation des particules intramembranaires au niveau de la membrane de la seconde vacuole parasitophore de *Sarcocystis muris* après l'exocytose des granules denses. L'extension de la membrane de la vacuole parasitophore peut être due à l'incorporation de composés parasitaires notamment à partir du matériel déversé des granules denses. Des phénomènes d'exocytose analogues se déroulent aussi chez *Toxoplasma gondii*, et plusieurs protéines de granules denses ont été localisées au niveau du réseau tubulo–membranaire intravacuolaire (Sibley et Krahenbuhl, 1988; Cesbron–Delauw *et al.*, 1989; Charif *et al.*, 1990; Leriche et Dubremetz, 1990).

La vacuole parasitophore contenant des toxoplasmes viables ne fusionne pas avec les lysosomes ni avec les autres systèmes endosomaux, et son pH interne ne baisse pas, à la différence des vacuoles qui contiennent des parasites couverts d'anticorps ou tués par la chaleur avant leur internalisation (Jones et Hirsch, 1972; Sibley *et al.*, 1985, Joiner *et al.*, 1990). La sensibilité aux pH acides et aux dérivés de l'oxygène à été démontrée chez certains Apicomplexa et notamment chez *Toxoplasma gondii* (Murray et Cohn, 1979; Hughes *et al.*, 1989). D'autre part, l'incompétence à la fusion des vacuoles contenant des toxoplasmes n'a été décelée qu'après l'entrée de parasites vivants, et elle est maintenue même si les parasites sont tués après l'invasion (Joiner *et al.*, 1990).

Les phagosomes formés chez les phagocytes sont normalement destinés à s'acidifier par l'activité des pompes à protons qu'ils contiennent et à fusionner avec les lysosomes. Comme les zoïtes des Apicomplexa se développent à l'intérieur d'autres cellules, au sein de ces vacuoles dérivées de la membrane plasmique d'où dérivent également les phagosomes, ces vacuoles parasitophores doivent donc être des formations différentes des phagosomes. Cette différenciation doit être élaborée par le parasite, puisque celui-ci doit être vivant au moment de la pénétration. Le rôle des différents organites dans la constitution de cette vacuole reste à déterminer.

VI-DONNEES ACTUELLES SUR LES ORGANITES DU COMPLEXE APICAL DE *TOXOPLASMA GONDII*

Une grande attention est actuellement portée sur les molécules localisées dans la région apicale de *Toxoplasma gondii*. En effet, toute information supplémentaire sur la composition moléculaire et le comportement des constituants des organites apicaux pourrait aider à éclaircir les mécanismes des différentes étapes de l'interaction Apicomplexa-cellule hôte.

Les micronèmes, sont supposés intervenir dans les processus de reconnaissance et d'attachement ou, avec les rhoptries, dans les sécrétions parasitaires qui faciliteraient l'invasion et l'édification de la vacuole parasitophore. Aucune donnée n'existe jusque-là sur le contenu de ces organites chez *Toxoplasma gondii*. Toutefois, ils sont à présent bien distingués des granules denses et des rhoptries avec lesquelles ils ont été longtemps confondus.

Les rhoptries sont par contre un peu mieux connues. Leur ouverture vers l'extérieur, la mise en évidence au niveau de leur membrane d'un arrangement périodique de particules intramembranaires (Porchet-Hennere et Nicolas, 1983), leur modifications morphologiques au cours de l'invasion (Nichols *et al.*, 1983) et la détection de certaines de leurs protéines sur la

membrane de la vacuole parasitophore (Kimata et Tanabe, 1987; Saffer *et al.*, sous presse) appuient l'hypothèse de leur fonction sécrétoire et de leur implication dans l'invasion. Grâce au fractionnement subcellulaire, à la production d'AcMc contre la fraction rhoptries-granules denses et à l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle (Leriche et Dubremetz, 1991), une grande complexité moléculaire a pu être mise en évidence au niveau de ces organites. Un bon repérage des différentes molécules (Schartzman, 1986; Dubremetz *et al.*, 1987, Sadak *et al.*, 1988; Schartzman et Krug, 1989) et des liens antigéniques entre celles regroupées en famille ou complexe a été établie. Il existerait au moins huit protéines différentes avec une répartition qui révèle une hétérogénéité de structure entre le pédoncule et la partie renflée (Roger-Leroux, 1990). Ces organites ont également une composante lipidique importante qui vient d'être décrite (Foussard *et al.*, 1991).

Les granules denses ont eux aussi une composition moléculaire complexe. Cinq molécules différentes ont été identifiées jusque-là: une de 21 kDa (Charif *et al.*, 1990), une de 27 kDa (Charif *et al.*, 1990, Leriche et Dubremetz, 1990), identique à la protéine liant le calcium de 23 kDa clonée et séquencée par Cesbron-Delauw *et al.* (1989), une de 28 ou 28,5 kDa (Charif *et al.*, 1990; Leriche et Dubremetz, 1991), glycoprotéine clonée par Prince *et al.* (1989), une de 30 kDa (Leriche et Dubremetz, 1991) et une de 32 kDa (Sibley et Krahenbuhl, 1988). Les protéines de 21, 27, 28 et 32 kDa ont été détectées dans le réseau tubulomembranaire intravacuolaire (Sibley et Krahenbuhl, 1988, Cesbron-Delauw et al, 1989; Charif *et al.*, 1990; Leriche et Dubremetz, 1990). Les modalités de l'exocytose du contenu de ces organites ne sont pas précisées. Certaines molécules des granules denses font partie des "exoantigènes" ou "antigènes d'excrétion-sécrétion", définition donnée par certains auteurs aux molécules récupérées dans le milieu d'incubation de toxoplasmes isolés (Darcy *et al.*, 1988) et contre lesquelles sont produits les AcMc qui réagissent avec les protéines de 21, 27 et 28,5 kDa décrites par Charif *et al.* (1990). L'observation de l'exocytose de ces organites juste à la

fin de l'invasion chez d'autres Apicomplexa comme *Plasmodium knowlesi* (Bannister *et al.*, 1977, Torii *et al.*, 1989b) et *Sarcocystis muris* (Entzeroth, 1985; Entzeroth *et al.*, 1986) suggère l'existence d'un mécanisme régulateur de l'exocytose.

D'autres structures ou régions définies morphologiquement ou par des anticorps font également partie du complexe apical. Il s'agit en particulier du conoïde. Par ailleurs, dans la pellicule, au niveau la proéminence apicale, ont été décrites des molécules très conservées, retrouvées chez les zoïtes de la plupart des Apicomplexa de 30 à 100 kDa (Sadak, 1988), parmi lesquelles pourrait se trouver l'antigène de 47 kDa identifié par Taylor *et al.* (1990) qui serait lié au système microtubulaire. Taylor *et al.* (1990) l'ont rapproché de l'actine localisée auparavant au niveau de l'apex de *Toxoplasma gondii*, sur le conoïde, les anneaux préconoïdaux et dans l'espace entre le complexe membranaire et le conoïde (Yasuda *et al.*, 1988; Endo *et al.*, 1988). Les données sur la détection de la myosine dans cette même région apicale (Schartzman et Pfefferkorn, 1983), incitent à penser à son implication dans la motilité et l'invasion des zoïtes de *Toxoplasma gondii*.

VII-BUT DU TRAVAIL

Notre travail a consisté dans un premier temps à différencier les organites du complexe apical de *Toxoplasma gondii* à l'aide d'une batterie de sondes anticorps mono et polyclonales monospécifiques, par la détermination en microscopie électronique des structures qui réagissent en immunolocalisation; dans un deuxième temps, à déterminer les caractéristique biochimiques du contenu de deux organites: les micronèmes et les granules denses, puis dans un troisième temps et dans le but de déterminer la fonction de ces organites, à suivre le devenir des différentes molécules identifiées et leur distribution dans les différents compartiments de la cellule hôte.

MATERIELS ET METHODES

A-MATERIELS BIOLOGIQUES

I-ANIMAUX

Nous avons utilisé des souris Swiss pour l'entretien des souches du parasite et des souris Balb/C pour la production des anticorps monoclonaux et des ascites. Des lapins (hybrides Néozélandais-Californiens) nous ont servis pour la production des sérums polyclonaux monospécifiques.

II-PARASITES

Pour le stade tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*, nous avons utilisé la souche virulente RH (Sabin, 1941). La souche 76K de *Toxoplasma gondii* (Laugier et Quilici, 1970) a servi à produire le stade bradyzoïte.

III-CELLULES UTILISEES POUR LE DEVELOPPEMENT IN VITRO DES TACHYZOITES DE *TOXOPLASMA GONDII*

Des cellules Véro (singe vert africain), des cellules MRC5 (poumon humain), et des cellules ETC (chat) sont utilisées comme cellules hôtes pour l'entretien *in vitro* des tachyzoïtes et pour les expérimentations *in vitro* sur des parasites intracellulaires.

IV-CELLULES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La fusion des splénocytes stimulés par des antigènes est réalisée avec des cellules de la lignée SP2/O dérivées d'un myélome de souris BALB/C. Ce sont des cellules non sécrétantes,

résistantes à 20 µg/ml de 8 azaguanidine et qui présentent une déficience en hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (HGPRT).

Des cellules nourricières, composées essentiellement de fibroblastes et de macrophages issus du lavage de la cavité péritonéale des souris Balb/C, sont utilisées pour éliminer les débris cellulaires après la fusion et pour permettre une bonne croissance des hybrides clonés.

B-METHODES

I-CULTURE CELLULAIRE

Le travail en condition aseptique est réalisé sous des hottes à flux laminaires stériles et à proximité d'une flamme de bec Bunsen. Le matériel en matière plastique du commerce (Costar, Falcon, ...) utilisé pour les cultures est stérile. Le matériel recyclé au laboratoire est stérilisé à la chaleur sèche (une heure à 160°C) ou à l'autoclave (20 mn à 120°C). Les milieux sont stérilisés par autoclavage ou par ultrafiltration.

I-1-Entretien des parasites

L'entretien *in vivo* des tachyzoïtes est assuré par des passages intrapéritonéaux chez des souris Swiss tous les trois jours. La production massive des parasites de ce stade est réalisée par l'administration simultanée de cellules sarcomateuses TG 180 (Couzineau et Beaufine-Ducrocq, 1969). Les souris sont sacrifiées par dislocation des vertèbres cervicales et leur cavité péritonéale est dégagée par incision de la peau. Les parasites sont récupérés par un lavage de la cavité péritonéale avec du milieu de culture DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco, SEROMED).

L'entretien *in vitro* des tachyzoïtes est réalisé sur des cellules Véro en couches monocellulaires dans des flacons de culture ou dans des bouteilles.

Pour purifier les tachyzoïtes à partir des cultures cellulaires *in vitro*, les tapis cellulaires au maximum de la parasitémie sont décollés dans leur milieu de culture par un grattoir en caoutchouc, récupérés dans un homogénéiseur de Dounce où les cellules hôtes sont éclatées. La suspension est alors filtrée sur une colonne de fibres de verre (Grimwood *et al.*, 1979).

L'entretien des bradyzoïtes se fait tous les deux mois chez des souris Swiss infestées par voie orale. Les kystes se développent dans tous les tissus mais surtout au niveau du cerveau à partir duquel ils sont isolés, selon la méthode de Cornelissen *et al.* (1981), pour l'entretien et l'expérimentation. Le cerveau des animaux infestés est lavé par du tampon PBS (phosphate: 50 mM pH 7,4; NaCl: 150 mM) pour enlever les cellules sanguines avant d'être broyé dans un homogénéiseur de type Potter en présence de 4 ml de PBS. Le broyat est passé sur un tamis en nylon à mailles de 180 µm, puis centrifugé pendant 5 mn à 600g. Le surnageant est remplacé par 8 ml de PBS additionné de 2 ml de Percoll isotonique et la suspension est centrifugée pendant 15 mn à 1000g. Les kystes sont récupérés à partir du culot après deux lavages en PBS par une centrifugation de 5 mn à 600g.

I-2-Culture et entretien des cellules utilisées pour le développement in vitro des tachyzoites

La culture en monocouche cellulaire et l'entretien des cellules sont réalisés dans des flacons en matière plastique placées dans des étuves à 37°C et à atmosphère contenant 5% de CO_2. Le milieu de culture utilisé est le DMEM additionné de glutamine (4 mM), d'antibiotiques (Pénicilline: 50 U/ml et Streptomycine: 50 µg/ml) et de sérum de veau foetal à 5% pour les cellules Véro et ETC ou à 10% pour les cellules MRC5. La division des boîtes est réalisée à la confluence du tapis cellulaire. La culture est décollée par une solution de

trypsine (Difco 1:250; 0,5%) et d'EDTA (0,1%) en solution saline de Puck (Gibco, BRL). Le liquide est en suite éliminé et les cellules sont décollées par des chocs mécaniques. Elles sont reprises immédiatement par du milieu de culture pour ensemencer d'autres boîtes.

I-3-Cultures des cellules utilisées pour la production des anticorps monoclonaux

Les SP2/O sont cultivées en milieu A (DMEM contenant 2% de sérum de veau foetal, 0,58 mg/ml de glutamine, 1% des acides aminés non essentiels (Seromed), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine).

Les cellules nourricières récupérées dans du milieu HT (milieu A contenant 10^{-4} M d'hypoxanthine et $1,6x10^{-5}$ M de thymidine) sont réparties dans les cupules des plaques de cultures cellulaires utilisées pour la culture ou le clonage des hybrides.

I-4-Production des anticorps monoclonaux

La méthode utilisée est celle de Köhler et Milstein (1975).

I-4-1-Immunisation des souris

Des souris Balb/C ont reçu par voie intrapéritonéale, 4 injections à 2 semaines d'intervalle, une émulsion du mélange des protéines recombinantes 205 et 421 purifiées (*cf.* paragraphe III-4), correspondant à 40 µg de chaque protéine à chaque inoculation, dans l'adjuvant complet de Freund (1ère injection) ou incomplet (à partir de la 2ème injection). Trois jours avant la fusion, un rappel par voie intraveineuse est effectué avec la même quantité du mélange des protéines dans du PBS.

I-4-2-Préparation des lymphocytes

Le jour de la fusion, la souris immunisée sélectionnée est sacrifiée par dislocation des vertèbres cervicales, sa rate est prélevée stérilement et broyée dans un homogénéiseur de potter. Les cellules spléniques sont lavées 3 fois par centrifugation à 400g pendant 5 mn à 4°C dans du milieu DMEM contenant 10 mM d'HEPES, puis elles sont numérées dans un hématimètre en présence de 0,5% de bleu Trypan (Seromed).

I-4-3-Hybridation cellulaire

Les splénocytes et les cellules myélomateuses sont mélangées dans un rapport de 5 pour 1 et centrifugées pendant 10 mn à 400g et à 4°C. Le culot est repris dans 1 ml de PEG-DMSO (30 g de polyéthylène glycol 4000 (MERCK) dissous dans 42 ml de PBS 0,1 M pH 7,2, additionné de 6,2 ml de diméthylsulfoxyde) ajouté goutte à goutte en 45 secondes sous agitation douce. Le PEG est dilué par l'adjonction progressive de DMEM contenant 10 mM d'HEPES à raison de 1 ml en 45 secondes, puis 10 ml en 2 mn, cette dernière opération est répétée 2 fois.

Les cellules fusionnées sont lavées 2 fois par centrifugation à 400g pendant 10 mn dans du milieu HT puis réparties à raison de $5x10^4$ cellules par puits dans des plaques de culture cellulaire à 96 puits contenant les cellules nourricières. Les cultures sont placées dans un incubateur à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de $C0_2$.

I-4-4-Sélection des hybrides

Les hybrides sont sélectionnés par le milieu HAT (milieu HT additionné de 10^{-4} M d'aminoptérine) où l'hypoxantine et la thymidine sont toxiques pour les cellules des myélomes mais pas pour les lymphocytes et les hybrides. Cette opération est réalisée par addition du milieu HAT à chaque puits de culture 24 heures après la fusion et par remplacement du

surnageant de celui-ci par le même milieu le 2ème, 3ème, 6ème et 9ème jours. Le milieu HAT peut être remplacé par le milieu HT puis par le milieu A à partir du 15ème jour de la culture.

I-4-5-Clonages des hybridomes

Les hybridomes produisant des anticorps sont sélectionnés à partir du surnageant des cultures confluentes, par immunofluorescence indirecte et immunoempreinte. Le clonage des hybrides sécréteurs est réalisé par la méthode de dilution limite. A partir d'un puits positif, une série de dilutions est réalisée de façon à obtenir une cellule par puits après la répartition dans des plaques de 96 puits. Un examen au microscope inversé des plaques permet de sélectionner les puits contenant chacun un seul clone. Les surnageants de ces puits sont testés à confluence et les clones sécréteurs d'anticorps sont multipliés par transfert progressif dans des alvéoles de taille croissante.

I-4-6-Production massive des anticorps monoclonaux

La multiplication des clones positifs peut être réalisée chez des souris Balb/C, dans la cavité péritonéale. Les animaux reçoivent auparavant une injection de pristane (tétramethyl-pentadécane) qui favorise le développement des tumeurs intrapéritonéales. Les anticorps sont récupérés dans le surnageant de la ponction d'ascite.

Lors de cette fusion nous avons sélectionné l'AcMc T9 4B9 qui reconnait la protéine recombinante 205.

Les AcMc T3 4A11, T4 2F3 et T4 1F5 ont été produit par Couvreur *et al.* (1988) et Sadak *et al.* (1988), la fusion ayant été réalisée après immunisation contre un lysat total de parasite. L'AcMc III3E10 a été sélectionné à partir de la production réalisée par Autheman *et al.* (non publié) selon la même méthode. L'AcMc T5 2B4 est issu de la fusion réalisée contre

la fraction subcellulaire rhoptries-granules denses des tachyzoïtes par Leriche et Dubremetz (1991). L'AcMc T6 2H11 a été produit au cours de la fusion réalisée après immunisation contre le surnageant de la fraction rhoptries.

I-5-Cryopréservation

Les parasites ou les différentes cellules utilisées peuvent être stockées sous forme congelée. Après élimination du milieu de culture par une centrifugation, les cellules sont reprises dans du sérum du veau foetal additionné de 10% de dimethylsulfoxide (DMSO) et la suspension est mise dans des cryules de plastique. Les cryules séjournent d'abord à -70°C 8 heures au moins puis sont ensuite placées dans des dispositifs de stockage contenant de l'azote liquide.

La décongélation se réalise par immersion des cryules dans un bain-marie à 37°C, après dilution de la suspension dans du milieu de culture, les cellules peuvent être remises en culture et les parasites réutilisés pour l'infestation.

II-MARQUAGES METABOLIQUES

II-1-Utilisation d'acides aminés radiomarqués

Le marquage des protéines des tachyzoïtes est réalisé par incubation *in vitro* des parasites en culture en présence de méthionine marquée au soufre radioactif (L-^{35}S-méthionine, activité spécifique > 3 TBq/mmol; Amersham), d'isoleucine tritiée (L-4,5-^{3}H-isoleucine, activité spécifique 2,9-4,4 TBq/mmol; Amersham) ou d'un mélange de cinq acides aminés tritiés (L-4,5-^{3}H-leucine, 4,4-7 TBq/mmol; L-4,5-^{3}H-lysine, 2,8-3,7 TBq/mmol; L-2,3,4,4,6-^{3}H-phénylalanine, 3,7-4,8 TBq/mmol; L-2,3,4,5-^{3}H-proline, 3,7-4,8 TBq/mmol; L-2,3,4,5,6-^{3}H-tyrosine, 2,6-3,7 TBq/mmol; Amersham). Les milieux d'incubation sont

préparés à partir du milieu RPMI (Gibco sélectamine kit) dépourvu de l'acide aminé ou du mélange utilisé pour le marquage et additionné du sérum de veau foetal dialysé. Les incorporations s'effectuent comme pour la culture dans une étuve à 37°C et dans une atmosphère à 5% de $C0_2$.

II-1-1-Marquage métabolique des tachyzoïtes en milieu acellulaire

Des tachyzoïtes purifiés, soit à partir d'une culture *in vitro* soit à partir d'une production massive *in vivo* sur des souris, sont lavés par du milieu dépourvu des cinq acides aminés utilisés pour le marquage. $1,5x10^8$ tachyzoïtes sont incubés pendant une heure avec 150 µCi du mélange des cinq acides aminés dans 3 ml de milieu.

Pour l'étude de la transformation des molécules après invasion, les tachyzoïtes sont lavés 3 fois par du milieu DMEM après le marquage, le tiers est stocké à −20°C et les autres (10^8 tachyzoïtes) sont resuspendus dans 3 ml de DMEM puis incubés dans une boite de 25 cm^2 contenant des cellules Véro confluentes. La chasse dure 1 heure au cours de laquelle des tachyzoïtes envahissent les cellules Véro. Le milieu est alors retiré et la boite est lavée par 3 fois 5 ml de milieu pour récupérer tous les tachyzoïtes qui n'ont pas pénétré dans les cellules Véro (50 à $65x10^6$). Les parasites ayant envahi les cellules sont collectés avec les cellules hôtes par grattage du fond de la boîte.

II-1-2-Marquage métabolique des tachyzoïtes intracellulaires

II-1-2-1-Marquage métabolique long

Des boîtes de 75 cm^2, contenant des tapis cellulaires confluents formés par des cellules Véro, sont infestées par $6x10^7$ tachyzoïtes. 24 heures plus tard, les cultures sont lavées par 2 fois 6 ml du milieu RPMI dépourvu des acides aminés utilisés pour le marquage et additionné de 5% de sérum de veau foetal dialysé. Elles sont incubées ensuite 4 à 6 heures en présence

du même milieu auquel sont ajoutés les acides aminés radiomarqués à une concentration de 20 µCi/ml.

Pour l'étude des transformations des molécules après la réinvasion, les tachyzoïtes sont purifiés à partir du tapis cellulaire après le marquage, lavés par du PBS puis par du milieu DMEM, une fraction est prélevée et congelée à -20°C et le reste (10^8 tachyzoïtes) et resuspendu dans 3 ml du milieu DMEM puis remis en culture pour infester des cellules Véro en culture dans une boîte de 25 cm^2. A la fin de la chasse, les tachyzoïtes extracellulaires et le tapis cellulaire infesté sont séparés comme décrit plus haut.

II-1-2-2-Marquage court

Des boîtes de 25 cm^2 de cellules Véro confluentes sont infestées 24 heures avant le marquage par $2x10^7$ tachyzoïtes. La procédure de marquage est identique à celle utilisée pour le marquage long mais l'incubation est arrêtée après 15 mn et suivie soit par la lyse immédiate (ou une congélation à -20°C avant la lyse) soit par une chasse de 30 mn, 1 ou 2 heures, où le milieu de marquage est remplacé par du milieu froid.

II-2-Marquage par les acides gras

Deux boîtes de 75 cm^2 contenant des cellules Véro infestées 24 heures auparavant par des tachyzoïtes sont lavées par du DMEM sans SVF. 500 µl d'acide palmitique ((9-10 (n)^{3}H) acide palmitique, 1,5-2,2 TBq/mmol; Amersham) ou d'acide myristique ((9-10 (n)^{3}H) acide myristique, 1,5-2,2 TBq/mmol; Amersham) sont séchés à l'azote pour éliminer le toluène dans lequel ils sont conservés. Le matériel sec est repris par 200 µl d'éthanol Normapur (95°) et introduit sur la culture à la concentration finale de 25 µCi/ml. La durée du marquage est de 6 heures. A la fin du marquage les tachyzoïtes sont purifiés du tapis cellulaire ou tout le tapis

infesté est utilisé. Pour d'autres marquages, nous avons introduit dans le milieu d'incubation ces acides gras après élimination du toluène et un couplage mole à mole à la sérum albumine.

II-3-Marquage par la glucosamine

500 µl de glucosamine (D-(6-^{3}H) chlorhydrate de glucosamine, 0,75-1,5 TBq/mmol; Amersham) sont ajoutés à 10 ml de milieu RPMI dépourvu de glucose mais supplémenté avec 22 mM de pyruvate de sodium. Ce milieu est introduit dans des cultures de cellules Véro parasitées dans des boites de 75 cm^2 à la concentration finale de 50 µCi/ml. La durée du marquage est de 4 à 6 heures.

III-TECHNIQUE IMMUNOCHIMIQUES

III-1-Préparation des immunoadsorbants

III-1-1-Immunoadsorbant à partir de sérum de lapin

Pour des immunoprécipitations avec les sérums des lapins immuns, 20 µl de ces sérums sont incubés avec 20 µl de protéine A-sépharose 4B (Pharmacia) préalablement gonflée dans du PBS. Le mélange dilué dans 1 ml de PBS est mis en agitation rotative à température ambiante pendant 2 heures pour permettre la fixation des immunoglobulines sur la protéine A.

III-1-2-Imunoadsorbant à partir d'IgG de souris

Deux procédures sont appliquées:

III-1-2-1-Adsorbtion des IgG sur un complexe immunoglobulines de lapin anti souris-protéine A-sépharose CL-4B

460 mg de protéine A-sépharose CL-4B commerciale (Pharmacia) sont mis à gonfler dans 9 ml de PBS pendant une heure à température ambiante. Après centrifugation (200g; 10

mn), le surnageant est éliminé et le gel est incubé pendant une nuit à 4°C avec 1,6 ml de sérum de lapin anti immunoglobulines de souris (RAM: Anti-mouse IgG H+L, Miles Scientific) dans un volume final de 10 ml en PBS. L'adsorption est achevée par élimination du surnageant après centrifugation et deux lavages au PBS. Le gel est resuspendu à une dilution au 1/5ème en PBS. Cette matrice peut servir à piéger les IgG à partir des sérums de souris immunes ou à partir d'ascites d'AcMc pour permettre l'immunoprécipitation des molécules correspondantes.

III-1-2-2-Couplage des immunoglobulines purifiées sur la sépharose 4B-CNBr

La purification des immunoglobulines à partir des ascites de souris est réalisée selon la technique de Saint-Blancard *et al.* (1982).

III-1-2-2-1-Chromatographie d'exclusion sur gel

3 ml d'ascite, centrifugée à 2000g pendant 15 mn ou filtrée, sont déposés sur une colonne GF05 de dimension 12 cm x 1 cm^2. L'équilibrage de la colonne avant son utilisation ainsi que l'élution des protéines sont réalisés avec du tampon 25 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl à pH 8,8. Le premier pic d'adsorption à 280 nm contient les protéines.

III-1-2-2-2-Chromatographie d'échange d'ions

Les protéines éluées de la colonne GF05 (équivalent de 3 fois le volume d'ascite déposé) sont passées sur une colonne DEAE-Trisacryl (Industrie Biologique Française) 12 cm x 1 cm^2. Les immunoglobulines sont élués par le tampon 25 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl à pH 8,8. Une fraction de l'éluat est analysée en gel de polyacrylamide SDS en condition réductrice (en présence de dithiothréitol: DTT) pour vérifier la pureté des immunoglobulines. L'éluat est

ensuite dialysé et concentré dans une cuve microprodicon (Bioblock) contre du PBS à 4°C pendant 48 heures dans un premier temps, puis contre du tampon bicarbonate salé (0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,6 contenant du NaCl à 0,5 M). L'estimation de la quantité d'immunoglobulines purifiées est faite par mesure spectrophotométrique (densité optique à 280 nm).

III-1-2-2-3-Couplage des immunoglobulines purifiées

10 mg d'anticorps monoclonal purifié, contenus dans 5 ml de tampon bicarbonate, sont mis en contact avec 300 mg de gel sépharose 4B activé par le bromure de cyanogène, préalablement gonflé dans une solution 1 mM HCl et lavé par du tampon bicarbonate. La suspension est mise en agitation rotative pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C. L'excès de protéines non couplées est éliminé par lavage dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH 8, puis les sites actifs libres du gel sont hydrolysés par ce même tampon à température ambiante pendant 2 heures. Le gel subit ensuite 3 lavages alternés dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4 contenant 0,5 M NaCl et dans le tampon bicarbonate de couplage. Après lavage dans du PBS, l'immunoadsorbant ainsi préparé est dilué au $1/5^{ème}$ dans du PBS.

III-2-Immunoprécipitation des protéines radiomarquées

III-2-1-Solubilisation des cellules

Nous avons utilisé deux méthodes pour la lyse des cellules (Véro infestées ou tachyzoïtes purifiés) après le marquage métabolique:

-par un tampon PBS contenant du NP40: 1%, EDTA: 2 mM, leupeptine: 0,01 mg/ml, aprotinine: 0,1 mg/ml et PMSF: 1 mM. La suspension subit une agitation rotative pendant 1 heure à 4°C et une centrifugation à 10000 g pendant 30 mn. Une fraction du surnageant est

prélevée pour le comptage de la radioactivité et le reste est conservé à −20°C pour l'immunoprécipitation.

−par un tampon Tris−HCl: 10 mM pH 8 contenant du NaCl: 150 mM, EDTA: 1 mM, SDS: 0,5%, Triton X−100: 1%, desoxycholate de sodium (DOC): 1% et des inhibiteurs de protéases, leupeptine: 0,01 mg/ml, aprotinine: 0,1 mg/ml et PMSF: 1 mM. Les cellules sont recupérées par 400 µl du NET (Tris−NaCl−EDTA−inhibiteurs de protéases) puis 100 µl de SDS 5% sont additionnés à cette suspension qu'on agite au vortex pendant 2 minutes. 500 µl du NET contenant du Triton X−100 à 2% et du DOC à 2% sont additionnés et la solubilisation est poursuivie sous agitation rotative pendant 30 mn à 20°C. Le surnageant, après une centrifugation à 10000g pendant 15 mn, est stocké à −20°C ou utilisé pour l'immunoprécipitation.

III−2−2−Formation des immunocomplexes

Les immunoadsorbants (20 µl de gel) préparés avec les AcMc purifiés, les sérums de souris ou de lapins sont mis sous agitation rotative pendant 16 heures à 4°C ou 2 heures à 20°C, en présence du lysat des cellules contenant $5x10^6$ cpm. Les gels séparés par une légère centrifugation sont lavés 5 fois 10 mn par un tampon (Tris−HCl: 50 mM pH 8,3; NP40: 0,5%; NaCl: 1 M) puis une fois par un tampon Tris−HCl 5mM pH 6,8. L'élution des immuncomplexes est opérée à l'aide du tampon échantillon d'électrophorèse par chauffage pendant 5 mn à 95°C.

III−3−Purification par affinité des protéines parasitaires

III−3−1−Lysat parasitaire

Des tachyzoïtes ($20x10^9$) provenant d'une production massive *in vitro* ou *in vivo* sont lavés 2 fois en PBS. Le culot de parasites est repris dans un tampon de lyse (Tris−HCl: 50

mM pH 8,3; NP40: 0,5%; EDTA: 2 mM; NaCl: 150 mM, et des inhibiteurs de protéases, aprotinine: 0,1 mg/ml et PMSF: 2 mM). La suspension est mise en agitation rotative à 4°C pendant 30 mn puis centrifugée à 30000g pendant 1 heure à 4°C.

III-3-2-Immunoadsorbtion par chromatographie d'affinité

Les colonnes montées avec 10 ml d'immunoadsorbant (préparé avec l'AcMc T4 2F3 ou l'AcMc T6 2H11) sont équilibrée par le tampon (Tris-HCl: 50 mM pH 8,3; NaCl: 150 mM; NP40: 0,5%; EDTA: 2 mM). 200 ml du lysat parasitaire sont passés sur les colonnes montées en série pendant 24 heures à 4°C avec recyclage. Les colonnes sont ensuite lavées chacune par 300 ml de tampon (Tris-HCl: 50 mM pH 8,3; NaCl: 1 M; NP40: 0,5%), puis 50 ml du même tampon sans NaCl et enfin par 50 ml de tampon (Tris-HCl: 50 mM pH 8,3; Désoxycholate de Na (DOC): 0,5%). Ce dernier lavage est terminé à température ambiante et les colonnes sont éluées par 25 ml du tampon d'élution (Diéthylamine-HCl: 0,1 M pH 11,5; DOC: 0,1%). Les éluats sont directement dialysés et concentrés sous vide dans une cuve microprodicon.

III-4-Purification des protéines recombinantes

III-4-1-Préparation des bactéries transformées

Deux plasmides contenant chacun un fragment du génome de *Toxoplasma gondii* (souche RH) sélectionné à partir d'une banque d'expression en λgt11 ont été utilisés (Mercereau-Puijalon *et al.*, en préparation). Ces plasmides expriment des protéines de fusion (βgalactosidase) sur lesquelles peuvent être fixés et élués des anticorps anti-Toxoplasmes, reconnaissant respectivement une protéine apicale de 60 kDa (421) et une protéine de 40 kDa distribuée dans des organites situés de part et d'autre du noyau des tachyzoïtes.

La souche CMK 603 F', iQlacZ d'*E. coli* a été utilisée pour les transformations et l'expression des plasmides.

III-4-2-Culture bactérienne et expression des protéines de fusion (à activité βgalactosidase)

Des cultures massives des bactéries transformées sont lancées à partir de précultures dans le milieu LB (Tryptone: 10 g/l; extrait de levure: 5 g/l; NaCl 5 g/l; NaOH: 0,01 N; carbaniciline: 100 µg/ml; tétracycline: 10 µg/ml) sous agitation à 37°C. Lors de la phase exponentielle de croissance (densité optique à 600 nm: 0,5), 1 mM d'isopropyl thio β-D-galactopyranoside (IPTG) est additionné au milieu de culture pour permettre l'expression du gène de la βgalactosidase et donc de la protéine recombinante. Les bactéries sont récupérées après 3 heures de culture par centrifugation à 4°C pendant 10 mn à 2000g. Le culot bactérien est resuspendu dans le tampon (Tris-HCl: 20 mM pH 7,4; $MgCl_2$: 10 mM) puis lysé aux ultrasons pendant 5 fois 30 secondes. Le lysat bactérien est centrifugé à 10000g pendant 20 mn pour récupérer le surnageant.

III-4-3-Dosage de l'activité βgalactosidasique

Un volume du lysat bactérien est dilué dans 1 ml du tampon (phosphate de sodium: 0,1 M pH 7; KCl: 0,01 M; $MgSO_4$: 0,001 M; βmercaptoethanol: 0,05 M) et placé à 29°C pendant 5 mn. 250 µl de O-nitrophenol-β-D-galactopyranoside (ONPG: substrat de l'enzyme) 0,1 M dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7, sont additionnés. Pour arrêter la réaction, 500 µl d'une solution $NaCO_3$ 1 M sont additionnés au mélange. La densité optique du mélange de la réaction est lue à 420 nm et l'activité βgalactosidasique est déduite selon la formule suivante:

$$\text{Nombre d'unités/ml d'echantillon} = \frac{DO_{421} \times 1{,}75 \times 1000}{V \times t \times 5}$$

- 1 Unité βgalactosidase correspond au nombre de moles ($x10^{-12}$)d'ONP produits par minute et par ml d'échantillon initial.

- 10^{-12} mole d'ONP (produit de la réaction) à une DO de 0,005, 1000/5 est un facteur de correction.

- 1,75 = volume final du mélange de la réaction

- V = volume de l'échantillon utilisé dans la réaction (en ml)

- t = temps de la réaction (en minutes)

III-4-5-Chromatographie d'affinité

Nous avons utilisé un gel d'affinité p-Aminophényl-β-D-Thiogalactoside (pAPTG) préparé selon la méthode de Ullman (1984). Pour 1 ml de gel utilisé, un volume équivalent à 10^6 unités de la βgalactosidase de l'extrait bactérien est prélevé puis ajusté au concentrations finales de 1,6 M NaCl et 10 mM βmercaptoethanol. Le lysat ajusté est ensuite passé 3 fois sur la colonne équilibrée. Le gel est lavé par l'équivalent de 200 fois son volume par le tampon d'équilibrage. Les protéines recombinantes sont éluées à partir du gel par une solution borate de sodium 100 mM; βmercaptoethanol 10 mM.

L'activité βgalactosidase et la quantité totale de protéines sont mesurées dans l'éluat qui est ensuite dialysé et concentré avant son stockage à -70°C.

III-5-Production des sérums polyclonaux monospécifiques

Des sérums polyclonaux dirigés contre les protéines recombinantes 205 et 421 ont été produits chez des souris. L'immunisation est réalisée par des injections intrapéritonéales toutes les trois semaines d'une émulsion de la protéine recombinante (40 µg) purifiée dans l'adjuvant complet de Freund (la première injection) ou incomplet (à partir de la seconde injection). Les sérums utilisés pour la caractérisation des protéines chez le parasite sont collectés deux semaines après les $2^{ème}$ et $3^{ème}$ rappels.

Des sérums polyclonaux monospécifiques de chacune des protéines recombinantes ou des protéines purifiées par chromatographie d'affinité sur les immunoadsorbants préparés avec les AcMc T4 2F3 et T6 2H11 sont également produits chez des lapins. L'immunisation est réalisée selon la technique de Vaitukaitis *et al.* (1971) par injections sous cutanées avec les émulsions des protéines à des intervalles de 2 ou 3 semaines. Les sérums collectés deux semaines après les deuxième rappels sont utilisés pour la caractérisation des protéines chez le parasite.

IV-TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

IV-1-Analyse monodimensionnelle des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (SDS-PAGE)

L'analyse électrophorétique des protéines est effectuée selon la technique décrite par Laemmli (1970). Un gel de séparation de 0,75 mm d'épaisseur et de 15 cm de hauteur (ou de 8 cm pour des mini gel) à 12% en acrylamide dans un tampon (Tris-HCl: 375 mM pH 8,8; SDS: 0,1%) préparé à partir d'une solution mère de 30% acrylamide et 0,8% bis acrylamide. Le gel de concentration de 2 cm de hauteur (1 cm pour des mini gels) de concentration 5% d'acrylamide est préparé dans un tampon (Tris-HCl: 125 mM pH 6,8; SDS: 0,1%).

Les échantillons sont repris dans du tampon (Tris-HCl: 62,5 mM; SDS: 2%; saccharose: 10%; bleu de bromophénol: 0,2%; et selon les cas avec ou sans dithiothréitol: 0,1%). La solubilisation est opérée par chauffage à 95°C pendant 5 mn. La séparation électrophorétique est réalisée par un courant électrique d'une intensité de 4 mA par plaque pendant 16 heures ou 25 mA par plaque de mini gel pendant 30 mn.

La calibration des protéines est réalisée à l'aide de dépôts parallèles de marqueurs de poids moléculaires (LMW kit: bas poids moléculaires, Pharmacia; MW-SDS-200: haut poids moléculaires, Sigma).

IV-2-Analyse bidimensionnelle des protéines par isoélectrofocalisation et SDS-PAGE: 2D-électrophorèse

L'électrophorèse bidimensionnelle est réalisée selon la technique décrite par O'Farrel (1975).

La première dimension est une isofocalisation où les protéines sont séparées dans un gel d'acrylamide à 4% contenant 9,5 M urée, 2% de NP40 et 2% d'ampholytes pH 3,5-10 (Servalyt). Le gradient de pH est établi par une électrophorèse préliminaire à 200 V pendant 15 mn puis 400 V pendant 30 mn. Les échantillons sont déposés dans le tampon utilisé pour préparer le gel mais additionné de 0,3% de SDS et l'électrophorèse est réalisée à 400 V pendant 18 heures puis terminée sous une tension de 800 V pendant une heure. Un gel témoin est découpé en morceaux de 4 mm de long. La détermination du pHi le long du gel est effectuée par mesure du pH résultant de l'incubation de ces morceaux du gel dans l'eau distillée dégazée.

L'électrophorèse dans la deuxième dimension est un SDS-PAGE comme décrit ci-dessus.

IV-3-Electrophorèse préparative et électroélution des protéines

Après purification de la protéine des granules denses par chromatographie d'affinité sur l'immunoadsorbant préparé avec l'AcMc T6 2H11, la bande de 30 kDa est isolée des contaminants résiduels par électroélution. L'éluat de l'immunoadsorbant subit une séparation électrophorétique dans un gel à 12% d'acrylamide de 1,5 mm d'épaisseur. Le gel est coloré à la fin de l'électrophorèse au chlorure de cuivre. Il s'agit d'une coloration négative selon la description de Lee *et al.* (1987). Le gel est trempé quelques secondes dans de l'eau avant d'être mis en agitation douce dans une solution de chlorure de cuivre 0,3 M pendant 5 mn. Après un rinçage à l'eau de 3 mn, les bandes de protéines incolores sont distinguées sur le fond verdâtre du gel.

Les bandes sont repérées par rapport aux marqueurs du poids moléculaire et découpées du gel. Le colorant est éliminé par 3 bains de 15 mn chacun dans la solution (Tris-HCl: 250 mM pH 9; EDTA: 250 mM). Les bandelettes du gel sont découpées en petits morceaux après un équilibrage dans le tampon de migration (Tris: 0,025 M pH 8,3; glycine: 0,192 M; SDS: 0,1%). Les protéines sont électroéluées du gel dans une cuve ISCO (ISCO électroélution cup, ISCO Inc, Lincoln, Ne 68 505) sous une puissance constante de 3 Watts par cuve pendant 3 heures. La pureté de l'électroéluat est vérifiée en SDS-PAGE et coloration au nitrate d'argent et par immunoempreinte après transfert sur feuille de nitrocellulose.

IV-4-Détection des protéines par coloration au nitrate d'argent

Après électrophorèse, les protéines séparées sont visualisées par coloration du gel de séparation au nitrate d'argent selon la méthode de Morrissey (1981). Le gel est traité successivement pendant 30 mn par les fixateurs suivant:

-méthanol distillé 50% et acide acétique pur 10%,

-méthanol 5% et acide acétique 7%,

-glutaraldéhyde 10%.

Ensuite, le gel est rincé abondamment à l'eau bidistillée pendant 2 à 3 heures. Les protéines sont réduites par du dithiothréitol (5 µg/ml) puis le gel est trempé dans une solution de nitrate d'argent 0,1% sous agitation pendant 30 mn. Après un rapide lavage à l'eau, la coloration est réalisée par une solution de carbonate de sodium à 3% contenant 0,018% de formaldéhyde. La coloration est arrêtée par de l'acide citrique 2,3 M pendant 10 mn et le gel est lavé plusieurs fois à l'eau avant d'être séché.

IV-5-Fluorographie

La détection des protéines radiomarquées au tritium complexées aux immunoadsorbants ou à partir d'un lysat total des cellules est réalisée sur les gels après séparation électrophorétique. Le gel est d'abord coloré au bleu de coomassie R-250 (Merck) 0,02% dans une solution à 10% d'acide acétique et 25% d'isopropanol, puis décoloré dans une solution de 10% d'acide acétique. Le gel est ensuite traité avec un agent scintillant (EnHance, NEN) pour pallier le faible pouvoir pénétrant des particules émises. L'incubation dure 1 heure puis l'agent scintillant est précipité par l'eau durant une demi- heure. Le gel est séché sous vide sur un papier Whatman N°3, puis exposé à un film X-OMAT AR Kodak à -70°C.

IV-6-Electrotransfert

Après électrophorèse en SDS-PAGE ou 2D-électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur une feuille de nitrocellulose (Pores 0,45 µm, Schleider et Schuell, Céra-Labo) à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec (LKB) selon la méthode de Towbin *et al.* (1978). Pour cette opération, le gel de séparation est appliqué contre la feuille de nitrocellulose et les deux sont insérés entre deux séries de feuilles de papier Whatman N°3 imbibées d'une solution de transfert (Tris 48 mM pH 8,9; glycine 39 mM; SDS 0,0375%; méthanol 20%). Le transfert

est réalisé entre deux électrodes de graphite pendant une heure sous ampérage constant (0,8 mA/cm^2) ou 30 mn sous 2 mA/cm^2.

Après le transfert, la feuille de nitrocellulose est colorée au rouge ponceau (0,2% dans une solution à 3% d'acide trichloracétique) pendant 10 mn et rincée ensuite à l'eau.

IV-7-Immunoempreinte

Pour la révélation immunochimique des protéines transférées, la feuille de nitrocellulose est découpée en bandelettes qui sont incubées pendant 30 mn dans une solution à 5% de lait écrémé en poudre (Gloria) dans du tampon TNT (Tris-HCl 15 mM pH 8; NaCl 140 mM; Tween 20 0,05%). Cette incubation permet la saturation des sites d'adsorption non spécifiques. Les bandelettes sont incubées ensuite, pendant 1 heure à température ambiante (20°C), dans une dilution en TNT des sérums des lapins au 1/7000ème ou des ascite et des sérums des souris au 1/250ème ou des surnageant de culture des hybridomes au 1/10ème. Après 3 lavages en TNT, les bandelettes sont incubées dans une dilution au 1/7500ème du sérum de lapin anti immunoglobulines de souris ou de chèvre anti immunoglobulines de lapin selon la nature des anticorps utilisés lors de la 1ère incubation. Ces seconds anticorps sont conjugués soit à la phosphatase alcaline soit à la peroxydase. La révélation de la phosphatase alcaline est effectuée après 3 lavages en TNT et une incubation à l'obscurité en présence de substrat BCIP (bromo-chloro-indolyl-phosphate) et du colorant NBT (nitroblue tetrazolium). La révélation de la peroxydase est effectuée après 3 lavages en TNT et un lavage en PBS et une incubation en présence de DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) à 0,1% dans du PBS additionné de 1/1000ème de H_2O_2 à 30%. Les révélations sont arrêtées par lavage à l'eau bidistillée, après apparition des bandes détectées.

V-ESSAIS D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

V-1-Immunofluorescence sur parasites isolés

Des tachyzoïtes ou des bradyzoïtes purifiés, mis en suspension dans du PBS (à une concentration de $2,5x10^6$ zoïtes/ml), sont déposés dans des puits de lames porte-objet à 10 cercles (Bio-Mérieux), à raison de $5x10^4$ par puits (20 µl/puits). Un autre lot de lames reçoit des zoïtes fixés par une solution de formaldéhyde à 2% dans du PBS pendant 10 mn et lavés 2 fois par du PBS avant le dépôt dans les puits. Les lames sont séchées à température ambiante puis conservées à -20°C.

Les zoïtes sont traités par un passage des lames dans un bain de 10 mn dans de l'acétone à -20°C. Les lames sont séchées avant les incubations en présence des anticorps. Pendant 30 mn à 37°C et en atmosphère humide, les puits reçoivent 20 µl du surnageant de culture (lors des tests des puits confluents pour sélectionner les hybridomes ou les clones positifs produisant des anticorps monoclonaux) ou d'une dilution de sérum (de souris ou du lapin) ou d'ascite dans du PBS (dilution allant de $1/20^{ème}$ au $1/100^{ème}$). Des puits témoins reçoivent du PBS seul. Après lavage par du PBS (2 fois 5 mn), les anticorps fixés sont révélés (selon leur provenance: de souris ou de lapin) par des anticorps de lapin (immunisé contre les immunoglobuline de souris) ou de chèvre (immunisée contre les immunoglobulines du lapin) conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine dilués au $1/50^{ème}$ dans le PBS contenant du Bleu Evans dilué au $1/10000^{ème}$. Chaque puits, y compris les témoins, reçoit 20 µl de la dilution du deuxième anticorps conjugué; l'incubation en chambre à atmosphère humide et à l'obscurité dure 30 mn à 37°C. Après des lavages par du PBS, les lames sont montées sous lamelles en PBS à 50% de glycérol contenant 0,1% de phénylènediamine (MERK). Les puits sont examinés au microscope en épifluorescence (LEITZ orthoplan).

V-2-Immunofluorescence sur des tachyzoïtes en culture cellulaire

Pour l'immunofluorescence sur les tachyzoïtes en invasion ou intracellulaire, des cellules Véro, MRC5 ou ETC sont cultivées sur des lames de microscopes équipées par des chambres Flexiperm (Heraeus)(15000 cellules par puits de surface 0,2 cm^2). A 80% de confluence des tapis cellulaires, la température des lames est stabilisée à 4°C par un contact avec de la glace, le milieu est substitué (ou additionné) par un suspension de tachyzoïtes (40000/puits) stabilisé également à 4°C. Après sédimentation des tachyzoïtes au fond des puits, 10 mn à 4°C, les lames sont replacées à 37°C. Les préparations sont fixées après 15 mn, 1, 6 ou 24 heures par immersion des lames dans un solution de 2% de formaldéhyde dans le PBS durant 30 mn. Les lames sont ensuite lavées en PBS (2 fois 10 mn). Elles passent par une succession de bains d'acétone (100% à -20°C: 2 mn / 50% à 4°C: 2 mn / 100% à -20°C: 2 mn) pour permettre la perméabilisation des cellules. Le reste des étapes des réactions d'immunofluorescence indirecte est effectuée comme est décrit précédemment. Les anticorps sont utilisés à des dilutions de 1/100ème.

VI-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

VI-1-Etude ultrastructurale de l'invasion

Des cellules Véro sont cultivées en couches monocellulaires dans une plaque de polyéthylène à cupules de 2,2 cm de diamètre (Costar). La plaque dont les puits sont à 80% de confluence sont stabilisés à 4°C par un contact des plaques avec la glace dans un bac pendant 15 minutes. Le milieu de culture est retiré des puits de culture et remplacé ensuite par 2 ml d'une suspension de tachyzoïtes ($5x10^7$/ml) isolés, prélevés de la cavité péritonéale des souris, et également stabilisée au préalable à 4°C. La plaque de culture est laissée en contact

avec la glace pendant 10 autres minutes pour permettre la sédimentation des parasites et leur contact avec les cellules Véro. La préparation est ensuite placée dans une étuve à 37°C.

Après 15; 20; 30 mn ou 1 heure, 2 ml d'une solution de fixation (glutaraldehyde à 2,5% dans un tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4) sont additionnés à chaque puits. 2 mn après, le surnageant est retiré des puits et est remplacé par 2 ml de fixateur frais. La fixation dure 1 heure à température ambiante. Les puits sont lavés 3 fois 10 mn avec du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4. Les cellules infestées sont postfixées pendant 1 heure à température ambiante par du tétraoxyde d'osmium en solution à 1% dans le même tampon. Elles sont déshydratées par une série de bains à concentration croissante d'alcool (éthanol 70°: 10 mn; éthanol 95°: 2 fois 15 mn, éthanol 100°: 3 fois 20 mn). Les couches monocellulaires infestées sont décollées au premier bain d'oxyde de propylène (le fond de la plaque commence à se dissoudre dans l'oxyde de propylène, et le tapis cellulaire se détache sous forme d'une crêpe flottante), récupérées puis centrifugées à 10000g pendant 10 mn. Le culot est incubé dans un deuxième bain de 20 mn dans de l'oxyde de propylène, puis d'une heure à 37°C dans un mélange (volume/volume) d'oxyde de propylène/Epon et à la fin une incubation de 15 heures dans de l'Epon pur. L'inclusion finale et la polymérisation en Epon sont effectuées à 60°C durant 48 heures.

Les coupes fines effectuées à l'ultramicrotome ULTRACUT (REICHERT) sont récupérées sur des grilles de cuivre recouvertes d'une membrane de parlodion. Certaines coupes fines et sériées sont effectuées et récupérées sur des grilles de cuivre à barreaux parallèles et membranées. Les coupes sont colorées 2 mn à l'obscurité par l'acétate d'uranyle (2% P/V dans de l'alcool à 50°), rincées à l'eau puis contrastées par du citrate de plomb (Réactif de Reynolds) pendant 2 mn à l'abri du CO_2. Les grilles rincées à l'eau bidistillée sont séchées avant d'être examinées au microscope électronique HITACHI H600.

VI-2.Immunolocalisation ultrastructurale

V-2-1.Préparation des échantillons

Des kystes purifiés contenant des bradyzoïtes de la souche 76K, des cellules TG180 infestées par des tachyzoïtes ou des couches monocellulaires de cellules Véro infestées par des tachyzoïtes sont fixés par des solutions de PBS contenant un mélange de glutaraldehyde/paraformaldehyde (0,05%/4% ou 0,1%/1%). Les fixations durent 10 ou 15 mn à température ambiante (20°C). Le fixateur est éliminé par centrifugation de 5 mn à 10000g des suspensions cellulaires (kystes ou cellules TG180 infestées) ou après décollement du tapis cellulaire dans le fixateur et centrifugation de l'ensemble. Les culots sont lavés 3 fois 10 mn à 4°C par du PBS et déshydratés par des passages de 10 mn dans des bains d'éthanol à concentration croissante (alcool 30° à 4°C; alcool 50° à 4°C; alcool 70° à -20°C; alcool 95° à -20°C). La déshydratation et le début de l'inclusion sont poursuivies par un bain de une heure à -20°C dans un mélange (1V/2V) d'éthanol 95°/LR White (London Resin Co), puis 3 fois une heure à -20°C et 16 heures à 4°C

dans du LR White pur. La polymérisation est opérée à 37°C pendant 5 jours ou 24 heures à 50°C suivies de 2 jours à 37°C.

VI-2-2.Immunolocalisation

Les coupes ultrafines récupérées sur des grilles de nickel membranées sont incubées pendant 30 mn en chambre humide et à température ambiante sur une solution de PBS contenant 2,5% de lait écrémé en poudre (Gloria) et 0,01% de Tween 20 (cette solution a servi également pour toutes les dilutions des différents réactifs utilisés dans les étapes ultérieures). Les grilles sont ensuite transférées sur des surnageants de cultures des clones d'hybridomes produisant des AcMc ou des dilutions des ascites ou des sérums (de souris ou lapins avant et après immunisation).

Les incubations ont été effectuées en chambre humide, la durée et les concentrations des sérums et ascites utilisés ont été variables selon la réactivité des anticorps. Nous avons utilisé des dilutions allant de 1/20ème au 1/200ème et des temps d'incubation allant de 30 mn (à 37°C) à 16 heures (à température ambiante). Après chaque incubation, les coupes sont lavées plusieurs fois par du PBS contenant 0,01% de Tween 20 (PBST).

Les anticorps des lapins sont révélés directement par incubation des coupes sur une solution d'anticorps de chèvre couplés à l'or colloïdal 10, 15 ou 20 nm (Janssen) et dirigés contres les IgG des lapins ou sur une solution de protéine A couplée à l'or colloïdal 5 ou 8 nm (préparé au laboratoire selon la méthode de Slot et Geuze, 1985).

Les coupes incubées sur des surnageants de culture, des dilutions de sérums de souris ou des ascites sont transférées après des lavages sur une solution d'anticorps de lapin dirigés contre les IgG et les IgM des souris, purifiées par affinité (Jackson Immunoresearch), dilué au 1/200ème, lavées puis transférées sur une dilution au 1/50ème d'anticorps de chèvre anti immunoglobulines de lapin couplés ou sur une solution de protéine A couplée à l'or colloïdal.

Les derniers lavages sont effectués successivement avec du PBST, du PBS puis l'eau bidistillée. Les grilles sont alors séchées et mises sur des gouttes d'acétate d'uranyle à 4% dans l'eau pendant 15 mn à l'obscurité pour colorer les coupes. L'examen est réalisé au microscope électronique HITACHI H600.

RESULTATS

I-SELECTION DES SONDES ANTICORPS SPECIFIQUES DES ORGANITES DES ZOITES DE *TOXOPLASMA GONDII*

Pour l'étude et la caractérisation du contenu des différents organites de la cellule de *Toxoplasma gondii*, à l'aide de sondes mono- ou polyclonales, nous avons classé les anticorps produits au laboratoire selon les images qu'ils produisent en immunofluorescence indirecte (IFI) sur des tachyzoïtes isolés. Les images d'IFI obtenues sont principalement de quatre types:

-une fluorescence périphérique,

-une fluorescence en forme d'arcs sur la moitié apicale,

-une fluorescence polaire apicale,

-une fluorescence en grains intracytoplasmiques de part et d'autre du noyau (bipolaire).

Les résultats des immunolocalisations, sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, ont permis de déterminer précisément les organites subcellulaires correspondant à chaque image:

-la fluorescence périphérique correspond à un marquage de surface où les anticorps sont dirigés contres les protéines de membrane. Ces protéines peuvent être immunoprécipitées, pour la plupart, après iodination de la surface des tachyzoïtes; il s'agit par exemple de la P30 qui est un antigène majeur de la membrane des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*;

-la fluorescence en forme d'arcs sur la moitié apicale correspond à un marquage des bulbes des rhoptries; ainsi l'AcMc T3 4A7 qui réagit avec la famille de 55-60 kDa des rhoptries (Sadak *et al.*, 1988) donne une image de ce type;

-la fluorescence apicale est produite par plusieurs types d'organites dont la répartition ne dépasse pas le tiers antérieur du tachyzoïte. Il s'agit principalement de la pellicule au niveau de la proéminence apicale, du conoïde, des pédoncules des rhoptries et des micronèmes.

-la fluorescence bipolaire correspond à un marquage des granules denses. Cette fluorescence rappelle la répartition des organites telle qu'on les retrouve en ultrastructure.

Dans le présent travail nous avons sélectionné les anticorps qui réagissent avec le conoïde, les micronèmes et les granules denses.

Les différences entre les sondes réagissant avec un même organite ont été établies au cours d'une deuxième étape d'analyse en immunoblot sur des lysats de zoïtes de *Toxoplasma gondii*.

Enfin, nous avons essayé de déterminer les caractéristiques biochimiques des différentes molécules et leurs propriétés au cours des différentes étapes de l'interaction tachyzoïte-cellule hôte:

II-CARACTERISATION D'UNE PROTEINE DU CONOÏDE

II-1-Immunolocalisation

L'AcMc T4 2F6 réagit en IFI avec l'extrémité apicale des tachyzoïtes. En immunolocalisation, cet AcMc reconnaît, sur les coupes ultrafines des tachyzoïtes, des structures denses aux électrons, localisées au niveau de la proéminence apicale et identifiées comme étant des coupes du conoïde (Pl. X, fig. A). Les parasites pour lesquels les sections ne passent pas au niveau de cette formation ne réagissent pas avec l'AcMc.

II-2-Immunoempreinte

Sur immunoélectrotransfert de lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, l'AcMc T4 2F6 identifie une bande à 80 kDa (Pl. I, fig A, piste 5), qu'on retrouve dans le culot mais pas dans le surnageant du lysat des tachyzoïtes obtenu par congélation/decongélation (Pl. II, fig

A, pistes a4 et b4). Cet AcMc ne réagit pas sur des lysats traité par le DTT (Pl. I, fig. B, piste 5).

II-3-Incorporation de précurseurs radiomarqués

Après un marquage métabolique des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* par des acides aminés radiomarqués (^{35}S-méthionine, ^{3}H-isoleucine, ou le mélange des cinq acides aminés tritiés) (Pl. V, fig. A et B, pistes 6) ou par de la glucosamine ou du mannose tritiés, l'AcMc T4 2F6 immunoprécipite des protéines qui migrent à 80 kDa sous conditions réductrices ou non réductrices.

Aucune bande n'est visualisée sur les fluorographies de l'analyse électrophorétique après les immunoprécipitations effectuées sur les lysats des tachyzoïtes incubés avec des acides gras radiomarqués (acides myristique et acide palmitique).

II-4-Cinétique de biosynthèse de la protéine

L'analyse en SDS-PAGE de l'éluat de l'AcMc T4 2F6 en conditions réductrices (Pl. V, fig. B, pistes 4 à 6) ou en conditions non réductrices (Pl. V, fig. A, pistes 4 à 6) après immunoprécipitation effectuée sur un lysat de tachyzoïtes obtenu après marquage métabolique court de 15 mn (en présence du mélange de cinq acides aminés tritiés), montre une bande à 84 kDa. Après une chasse de 1 heure (en milieu froid du marquage court de 15 mn), l'immunoprécipitation avec l'AcMc T4 2F6 montre une seule bande à 80 kDa identique à celle obtenue après un marquage de 4 heures.

III-CARACTERISATION DES PROTEINES DES MICRONEMES

III-1-Immunolocalisation

Les AcMc T3 4A11, III 3E10, et T4 2F3 ainsi que les anticorps du lapin anti tachyzoïte purifiés par affinité sur les lysats de bactéries transformées-421 et les sérums des souris et du lapin immunisés avec la protéine recombinante 421 purifiée, ont donné une image de fluorescence apicale sur des tachyzoïtes et des bradyzoïtes. De plus, sur les coupes ultrafines de tachyzoïtes ou bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii,* ils réagissent exclusivement avec les sections d'organites de 30x150 nm, denses aux électrons, en formes de navette, localisés dans la région apicale et identifiés comme étant des micronèmes (Pl. X, fig. B et C). Aucun autre organite ne fixe les grains d'or colloïdal de façon significative.

III-2-Immunoempreintes réalisées avec les sondes anti micronèmes

Sur lysat de tachyzoïtes analysé en condition non réductrice (Pl. I, fig. A, pistes 1 à 4) les sérums anti 421 identifient une bande à 50 kDa. Les AcMc T3 4A11 et III 3E10 reconnaissent une large bande à environ 100 kDa. L'AcMc T4 2F3 révèle une bande majeure à 90 kDa et d'autres mineures à 98, 40 et 38 kDa.

Les immunoempreintes réalisées sur le surnageant (Pl. II, fig. A, pistes a1 à a4) et le culot (Pl. II, fig. A, pistes b1 à b4) obtenus après la lyse par congélations/decongélations des tachyzoïtes, nous ont permis de repérer la bande reconnue par les sérums anti 421 en même temps dans le surnageant et dans le culot du lysat, la bande correspondant à l'AcMc T3 4A11 dans le surnageant seulement et alors que celles correspondants à l'AcMc T4 2F3 sont repérées dans le culot.

En condition réductrice (Pl. I, fig. B, pistes 1 à 4), la molécule reconnue par les anti 421 migre à 60 kDa. Les AcMc T3 4A11 et III 3E10 identifient dans ces conditions une bande

majeure à 120 kDa en plus de deux bandes mineures à 116 et 110 kDa. L'AcMc T4 2F3 réagit avec une bande majeure à 38 kDa.

Sur des lysats de bradyzoïtes, les profils de reconnaissance pour chacune des sondes sont identiques à ceux des lysats de tachyzoïtes, que les conditions soient réductrices ou non.

La molécule de 60 kDa (50 kDa en condition non réductrice), identifiée par les sérums anti 421 possède un pHi de 6,5 déterminé par électrophorèse bidimensionnelle (après une isofocalisation des protéines d'un lysat de tachysoïtes ou de l'éluat d'un anticorps, les protéines subissent une séparation électrophorétique dans un gel à 12% d'acrylamide (SDS–PAGE)) (Pl. III, fig. A). L'AcMc T3 4A11 révèle un triplet dans les conditions réductrices ou non réductrices: une tache majeure de 120 kDa à un pHi de 5 et deux mineures de 116 et 110 kDa à un pHi identique de 5,95 (Pl III, fig. A et B). L'AcMc T4 2F3 reconnaît la molécule de 90 kDa (à partir d'un lysat non réduit) à un pHi de 6,75 (Pl. III, fig. A), quand le lysat est réduit avant chacune des migrations, cet AcMc reconnaît deux taches de 38 kDa aux pHi 6,75 et 6,5 (Pl. III, fig. C).

III–3–Incorporation des précurseurs radiomarqués

Les molécules des micronèmes incorporent toutes les acides aminés radiomarqués utilisés pour le marquage métabolique des tachyzoïtes intracellulaires. Après incubation des tapis cellulaires infestés par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, en présence de méthionine marquée au soufre radioactif ou d'isoleucine tritiée ou en présence du mélange des cinq acides aminés tritiés, les anticorps anti micronèmes immunoprécipitent des protéines dont le profil électrophorétique correspond aux bandes reconnues par chacun en immunoempreinte. Les variations éventuelles dans les migrations électrophorétiques, selon les conditions de réduction ou non, sont retrouvées pour chaque molécule. Après analyse en électrophorèse bidimension–nelle des éluats, on retrouve les taches qui migrent aux pHi déterminés par immunoempreinte.

La molécule de 60 kDa des micronèmes incorpore la glucosamine comme le montre la fluorographie après SDS-PAGE de l'éluat des sérums anti 421 (Pl. VI, fig. D, piste 2). Après une longue exposition des gels, les autres bandes correspondant aux molécules des micronèmes immunoprécipitées par les AcMc T3 4A11 et T4 2F3 (Pl. V, fig. C, piste 2) apparaissent également sur les profils des éluats correspondant.

Les incorporations des acides gras (acide palmitique et acide myristique) par les tachyzoïtes ont été recherchées sur les lysats radiomarqués et par immunoprécipitation de la protéine de surface P30 qui nous a servie de témoin positif (Tomavo *et al.*, 1990). Les essais d'immunoprécipitation réalisés avec les anticorps dirigés contre les contenus des micronèmes sur les mêmes lysats se sont révélés négatifs.

III-4-Cinétiques de biosynthèse des protéines

Sur des lysats des tachyzoïtes intracellulaires incubés en présence du mélange des cinq acides aminés tritiés obtenus soit juste après des marquages courts de 6 ou 15 mn, soit après des marquages courts de 6 mn suivis de chasses de 30 mn, 1 ou 2 heures en milieu froid, les sérums anti 421 (Pl. VI, fig. C) et l'AcMc T3 4A11 ou III 3E10 (Pl. VI, fig. A et B) immunoprécipitent les même protéines que celles identifiées après des marquages longs, respectivement de 60 kDa (50 kDa en conditions non réductrices) et de 120 kDa (environ 100 kDa en conditions non réductrices). L'AcMc T4 2F3 (Pl. V, fig. A et B, pistes 1 à 3) immunoprécipite deux molécules de 98 kDa et de 40 kDa à partir des lysats obtenus après les marquages courts de 6 à 15 mn. A partir des lysats des tachyzoïtes intracellulaires obtenu après un marquage suivi d'une chasse, l'AcMc immunoprécipite des bandes qui comigrent avec celles obtenues après des marquages long de 4 heures (à 90 kDa 38 kDa et une mineure à 98 kDa). L'analyse des immunocomplexes obtenus avec cet AcMc en conditions réductrices

d'électrophorèse révèle une seule bande de 40 kDa à partir des lysats obtenus lors des marquages courts, et une seule de 38 kDa à partir des lysats obtenus après des chasses.

IV-CARACTERISATION DES PROTEINES DES GRANULES DENSES

IV-1-Immunolocalisation

Les AcMc T4 1F5, T5 2B4, T6 2H11 et T9 4B9 et les anticorps de lapin anti tachyzoïte purifiés par affinité sur les lysats de bactéries transformées 205 et les sérums des souris et du lapin immunisés avec la protéine recombinante 205, marquent les tachyzoïtes et les bradyzoïtes isolés de *Toxoplasma gondii*. En IFI, les images observées sont de type bipolaire, sous forme de taches intracytoplasmiques. Nous avons observé un marquage sur les granules denses quand ces anticorps ont été testés en immunolocalisation ultrastructurale sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes ou de bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Les micronèmes, les rhoptries et les autres organites n'ont pas été marqués par ces anticorps. Les immunolocalisations réalisées avec une combinaison de deux anticorps révélés chacun par une taille différente des grains d'or colloïdal, montrent un marquage homogène de toutes les sections des granules denses avec les deux types de grains d'or (Pl. XV, fig.A).

IV-2-Immunoempreintes réalisées avec les sondes anti granules denses

Les anticorps anti granules denses réagissent avec des molécules dont les migrations varient peu après réduction par le DTT. En conditions réductrices (Pl. I, fig. B, pistes 6 à 9) aussi bien qu'en conditions non réductrices (Pl. I, fig. A, pistes 6 à 9), les anti 205 et l'AcMc T9 4B9 reconnaissent une large bande à 4O kDa (avec des concentrations faibles des anticorps, l'immunoempreinte se présente sous forme d'un doublet de 40-41 kDa); l'AcMc T4

1F5 deux bandes majeures de 28 et 70 kDa et les AcMc T5 2B4 et T6 2H11 respectivement une bande à 27 et à 30 kDa.

Sur des lysats de bradyzoïtes, les profils de reconnaissance pour chacune des sondes sont identiques à ceux obtenus avec des lysats de tachyzoïtes, que les conditions soient réductrices ou non.

Les immunoempreintes réalisées sur le surnageant (Pl. II, fig. A, pistes a5 à a8) et le culot (Pl. II, fig. A, pistes b5 à b8) obtenus après la lyse par congélations/decongélations des tachyzoïtes, montrent que les bandes reconnues par les anti 205 sont plus intenses dans le culot que dans le surnageant, la bande reconnue par l'AcMc T5 2B4 est présente seulement dans le surnageant, et celles reconnues par les AcMc T4 1F5 et T6 2H11 sont d'égale intensité dans le culot et dans le surnageant.

La révélation par l'AcMc T4 1F5 de l'imunoempreinte faite sur des cellules Véro non infestées par des Toxoplasmes montre une bande à 70 kDa identique à celle révélée sur lysats de tachyzoïtes purifiés sur laine de verre et celle sur lysat de l'ensemble tachyzoïtes–cellules Véro, et où l'AcMc révéle également la bande de 28 kDa (Pl I, fig C). Aucune des autres sondes ne réagit avec les cellules hôtes non infestées.

Après électrophorèse bidimensionnelle (Pl. III, fig. A), l'AcMc T5 2B4 révèle la molécule de 27 kDa à un pHi acide de 4,9, et l'AcMc T4 1F5 révèle la 28 kDa à un pHi basique de 7,8 et la 70 kDa à pHi 5,3. Les molécules reconnues par les sérums anti 205 et par l'AcMc T6 2H11 (non montré) ne sont pas focalisées à un pHi précis, les bandes reconnues aux poids moléculaires correspondants s'étendent sur presque toute la longueur du gel d'isofocalisation.

IV-3-Incorporation des précurseurs radiomarqués

Les anticorps anti granules denses (à l'exception de l'AcMc T5 2B4 dont l'immunoadsorbant n'a pas fonctionné dans les conditions utilisées ici) immunoprécipitent également les protéines correspondantes. Les profils électrophorétiques sont identiques à ceux des immunoempreintes réalisées sur des lysats de tachyzoïtes.

La protéine de 28 kDa des granules denses identifiée par l'AcMc T4 1F5 incorpore fortement la glucosamine. Après une courte exposition des gels contenant les éluats de l'immunoadsorbant, la bande de 28 kDa apparaît très intense, et est accompagnée d'une seconde aussi importante de 27 kDa et de deux autres plus faibles à 26 et 25 kDa (Pl. VII, fig. B, piste 2). Une seule bande à 41 kDa est observée sur le profil de l'éluat de l'anti 205 (Pl. VII, fig. C, piste 2) et de l'AcMc T9 4B9 (non montré), alors que la protéine de 30 kDa identifiée par l'AcMc T6 2H11 n'apparaît pas sur la fluorographie même après une longue exposition. Cette protéine ne paraît donc pas incorporer la glucosamine.

Comme pour les protéines des micronèmes, aucune incorporation des acides gras radiomarqués (acide palmitique et acide myristique) n'a été mise en évidence pour les protéines des granules denses.

IV-4-Cinétiques de biosynthèse des protéines

A partir des lysats réalisées après des marquages courts (15 mn en présence du mélange des cinq acides aminés) des tachyzoïtes intracellulaires, une bande mineure de 26 kDa est coimmunoprécipitée avec la protéine de 30 kDa par l'AcMc T6 2H11 et deux mineures de 26 et 27 kDa sont coimmunoprécipitées avec la bande majeure de 28 kDa et la bande mineure de 70 kDa par l'AcMc T4 1F5. Après une chasse de 1 heure en milieu froid, les bandes immunoprecipitées par ces AcMc sont respectivement identiques à celles identifiées après marquage long de 4 heures (Pl. VII, fig. A). Les profils des immunoprécipitations réalisées

avec les sérums anti 205 et l'AcMc T9 4B9 sur les lysats obtenus après des marquages courts et ceux des marquages courts suivis de chasse (non montré) sont identiques au profil de l'immunoprécipitation réalisée après des marquages longs de 4 ou 6 heures donnant le doublet de 40–41 kDa (Pl. VII, fig. C, piste 1).

V–PURIFICATION DES PROTEINES ET PRODUCTION DES SERUMS POLYCLONAUX

Les immunoadsorbants préparés avec les AcMc T4 2F3 et T6 2H11 ont servi pour purifier, à partir des lysats de tachyzoïtes, les protéines des micronèmes et des granules denses avec lesquelles ils réagissent respectivement. La présence de ces protéines dans les éluats des immunoadsorbants est vérifiée par coloration à l'argent des gels après SDS–PAGE et par immunoempreinte (Pl. IV, fig. A, B, C, D et E).

V–1–Purification de la protéine de 90 kDa des micronèmes

Dans l'éluat de l'AcMc T4 2F3, nous retrouvons essentiellement les bandes de 90 et de 38 kDa. Ces bandes sont celles qui sont principalement révélées par l'AcMc T4 2F3 en immunoempreinte (Pl IV, fig. A et B).

Un éluat total de l'immunoadsorbant de T4 2F3 nous a servi pour l'immunisation d'un lapin. Les sérums collectés à partir du deuxième et troisième rappels d'immunisation révèlent, sur immunoélectrotransfert de tachyzoïtes, les mêmes bandes que celles identifiées par l'AcMc T4 2F3 (Pl. IV, fig. F, pistes 1 et 2). Sur des coupes de tachyzoïtes, ce sérum réagit avec les micronèmes mais marque en plus les rhoptries (Pl. X, fig. D). Le sérum du même lapin avant immunisation utilisé à des dilutions équivalentes ne répond ni en immunoempreinte, ni en immunolocalisation.

V-2-Purification de la protéine de 30 kDa des granules denses

L'éluat de l'AcMc T6 2H11, contient essentiellement une bande à 30 kDa; des bandes faibles à 60 et 26 kDa sont visibles. Certaines autres bandes mineures figurent sur les profils électrophorétiques (comme dans les éluats de T4 2F3), une bande de 28 kDa par exemple est révélée en présence du sérum du lapin anti IgG de souris conjugué à la phosphatase alcaline, seul et sans incubation préalable avec les AcMc; elle doit correspondre à la chaîne légère des IgG (Pl. IV, fig. C, D et E).

Nous avons extrait la bande de 30 kDa par électroélution après séparation électrophorétique d'un éluat de l'immunoadsorbant T6 2H11 en SDS-PAGE sur gel d'acrylamide. Cette bande électroéluée migre bien au même poids moléculaire et elle est reconnue par l'AcMc T6 2H11 après SDS-PAGE. Nous nous sommes servis de cette électroéluat pour immuniser un lapin. Le sérum prélevé après le deuxième rappel reconnaît sur immunoélectrotransfert la même bande de 30 kDa identifiée par l'AcMc T6 2H11, il reconnaît également une bande de 26 kDa mais faiblement (Pl. IV, fig, F , pistes 7 et 8). En immunolocalisation, ce sérum réagit exclusivement avec les granules denses sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes et de bradyzoïtes (Pl. XIV, fig. A et B).

VI-DEVENIR DU CONTENU DES ORGANITES DU COMPLEXE APICAL LORS DE L'INTERACTION TACHYZOÏTE-CELLULE HOTE

VI-1-Observations en microscopie électronique des stades précoces de l'invasion

Au cours de ces observations, nous n'avons pas étudié le phénomène d'invasion ou de l'internalisation des tachyzoïtes proprement dite, déjà décrite par d'autres auteurs. Nous avons focalisé notre intérêt sur les étapes suivantes, qui concernent l'installation du parasite dans la vacuole parasitophore.

A la fin de l'invasion, une membrane étroitement appliquée contre le tachyzoïte l'isole du reste du cytoplasme de la cellule hôte. Des vésicules de diamètre allant jusqu'à 300 nm, contenant au centre quelques petits amas de matériel dense aux électrons sont visualisées dans la région apicale des tachyzoïtes (Pl. XI, fig. A). D'après les coupes sériées, nous avons pu constater qu'elles s'étendaient vers l'extrémité apicale en passant à travers le conoïde. Cette image est typique des rhoptries vidées de leur contenu déchargé au cours de l'invasion.

Au même stade, on observe dans la vacuole autour de l'apex du zoïte la concentration d'un matériel dense aux électrons. Ce matériel s'étale sur les bords de la paroi du parasite, dans l'espace étroit délimité par la membrane de la vacuole parasitophore. Les coupes sériées nous ont permis de montrer que ce matériel est en continuité avec des sites d'exocytose latérale sur les tachyzoïtes. Il s'agit de vésicules de densité moyenne, entourées par une membrane en continuité avec la membrane plasmique, au niveau d'une interruption du complexe membranaire interne. L'aspect de ces vésicules est identique à celui des granules denses (Pl. XI, fig. A et B).

Sur des coupes des stades plus avancés, on observe, au niveau de l'extrémité postérieure des zoïtes, la présence de poches de taille parfois assez importante, ouvertes vers l'espace vacuolaire et dont le contour présente un épaississement au niveau des feuillets du complexe membranaire interne. Ce dernier présente des interruptions à ce niveau. Le réticulum endoplasmique est bien développé à cet endroit. A l'intérieur de ces poches se trouve un réseau de tubules membranaires dont certains forment des amas compacts. On peut voir la connexion de quelques tubules à certains endroits avec la membrane de la vacuole parasitophore (Pl. XII, fig. A et B). On y trouve également des vésicules dont certaines semblent fusionner avec la membrane de la vacuole parasitophore qui n'est plus directement apliquée contre le parasite.

Les cellules Véro ou TG180, fixées plusieurs heures après l'infestation (Pl. XII, fig. C), présentent des vacuoles parasitophores délimitées par une membrane continue, bordée du côté du cytoplasme de la cellule hôte par des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Ces vacuoles contiennent des parasites en division; les cellules filles se constituant à l'intérieur de la cellule mère par endodyogénie. On rencontre, à des stades plus tardifs, des tachyzoïtes disposés en rosette, les extrémités apicales à la périphérie et l'extrémité postérieure au centre, avec parfois des individus liés par cette partie postérieure (des cas de divisions non achevées, allant jusqu'à quatre individus qui restent liés par leur extrémité postérieure), rappelant ainsi le plan de la séparation des cellules filles. Le réseau tubulo-membranaire est bien développé et remplit l'espace entre les tachyzoïtes. Des connections de ce réseau tubulo-membranaire avec la membrane de la vacuole parasitophore peuvent également être observées à ces stades.

VI-2-Localisation des protéines dans les cellules infestées

VI-2-1-Localisation des protéines des granules denses

Avec les anticorps dirigés contre le contenu des granules denses, on retrouve la fluorescence bipolaire sur les tachyzoïtes extracellulaires, en invasion ou intracellulaires dans les tapis formés par les cellules Véro ou MRC5. 30 mn après l'invasion, on observe en plus une diffusion du marquage autour des parasites intracellulaires (Pl. IX, fig. D). Ce marquage de la vacuole parasitophore est de plus en plus important après les multiplications des parasites dans les cellules fixées 24 heures après l'infestation (P. IX, fig. E et F). L'AcMc T6 2H11, à la différence des autres sondes, produit en plus un marquage des pourtours des vacuoles contenant les parasites (Pl. IX, fig. F).

Sur des coupes de cellules Véro fixées 15 mn après l'infestation par des tachyzoïtes, dans les vacuoles contenant des parasites en fin d'invasion, le marquage par les grains d'or colloïdal est repéré sur les sections des granules denses et sur les amas de matériel dense aux électrons

se trouvant autour de la région apicale des parasites (Pl. XI, fig. C et D). Sur les coupes des cellules Véro ou TG180 fixées plusieurs heures après l'infestation, le marquage est situé sur les sections des granules denses et sur le réseau tubulo-membranaire des vacuoles parasitophores (Pl. XIII, fig. A et B). Seul l'AcMc T6 2H11 produit en plus un marquage de la membrane de la vacuole parasitophore (Pl. XIII, fig. B).

Le sérum du lapin immunisé avec la protéine purifiée sur immunoadsorbant préparé avec l'AcMc T6 2H11 a les mêmes propriétés de marquage que le monoclonal correspondant: il réagit avec les granules denses, le réseau tubulo-membranaire et la membrane de la vacuole parasitophore (Pl. XIV, fig. A). Sur des coupes de kystes de la souche 76K, ce sérum réagit avec les granules denses des bradyzoïtes mais il marque également la paroi kystique (Pl. XIV, fig. B).

Sur les coupes ultrafines où nous avons réalisé des doubles marquages à l'aide d'une combinaison de deux sondes: l'AcMc T6 2H11 ou le polyclonal équivalent et une des autres sondes anti granules denses (anti 205, l'AcMc T4 1F5 ou l'AcMc T5 2B4), les sections des granules denses et le réseau tubulo-membranaire sont toujours doublement marqués. Sur la membrane de la vacuole parasitophore n'ont été observés que les grains d'or colloïdal utilisés pour la révélation de l'AcMc T6 2H11 (Pl. XV, fig. A, B et C).

VI-2-2-Localisation des protéines des micronèmes

La fluorescence apicale des tachyzoïtes, produite par les sondes anti micronèmes est observée sur les tachyzoïtes libres, en invasion ou à l'intérieur des cellules Véro ou MRC5 des tapis cellulaires fixés 15 mn, 1, 6 ou 24 heures après l'infestation. Une légère diffusion de la fluorescence est visualisée autours des tachyzoïtes intracellulaires en division dans les cellules fixés après les 6 ou 24 heures d'infestation. Les parasites sont disposés en rosettes dans les vacuoles parasitophores après 24 heures; les extrémités apicales fluorescentes sont disposées

à la périphérie et une légère diffusion de fluorescence les entoure (Pl. IX, fig. C). Les membranes plasmiques et le reste du cytoplasme des cellules hôtes ne sont marqués à aucun moment après l'interaction avec les tachyzoïtes.

En imunolocalisation, les grains d'or colloïdal sont observés sur les micronèmes des tachyzoïtes en coupes ultrafines pour tous les stades d'infestation. Sur les individus en division, les micronèmes des cellules filles en formation sont également marqués. Aucun marquage de la vacuole parasitophore ou du reste de la cellule hôte n'est observé.

Sur des coupes de kystes, l'AcMc T4 2F3 et le sérum du lapin immunisé avec l'éluat de cette anticorps reconnaissent les sections des micronèmes sur les bradyzoïtes mais également la paroi kystique.

VI-3-Affinité membranaire des protéines des micronèmes

VI-3-1-Révélation par immunofluorescence

Les cellules Véro incubées en présence du surnageant du lysat (par congélations/décongélations) de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* en PBS puis avec des anticorps anti toxoplasmes, montrent une fluorescence à leur surface seulement quand la réaction est réalisée avec les sérums anti 421, les autres anticorps anti micronèmes et anti granules denses ne montrent aucune réaction. Les cellules non incubées dans le surnageant du lysat des tachyzoïtes ne sont pas marquées par les anticorps (Pl. IX, fig. A et B).

VI-3-2-Révélation par immunoempreinte

Les sérums des souris ou du lapin anti 421 identifient une bande de 50 kDa sur le lysat des cellules MRC5 ou Véro préalablement incubées en présence d'un surnageant du lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, identique à celle identifiée sur le surnageant du lysat des tachyzoïtes seul analysé juste après la lyse ou après 1 heure d'incubation à 37°C (durée

équivalente à celle de l'incubation des cellules en présence du surnageant). En conditions réductrices d'électrophorèse, la bande est identifiée à 60 kDa. Cette bande comigre avec une des principales bandes identifiées sur les cellules incubées par le sérum du lapin anti tachyzoïtes. La variation dans la migration de cette bande principale en fonction des conditions de réduction lors de l'électrophorèse est identique à celle da la bande reconnue par les sérums anti 421. L'AcMc T3 4A11 qui identifie une large bande dans le surnageant du lysat des tachyzoïtes ne réagit pas sur les cellules incubées le surnageant du lysat des tachyzoïtes; le sérum du lapin anti tachyzoïtes ne reconnaît rien non plus dans la zone de la bande qui réagit avec l'AcMc T3 4A11. Le lysat des cellules non incubées avec le surnageant ne réagit avec aucun de ces anticorps (Pl. II, fig. B et C).

Nous avons incubé en présence du surnageant du lysat des tachyzoïtes les cellules Véro et MRC5, soit directement en couche monocellulaire dans des boites de cultures à 37°C, soit en agitation rotative à 4°C après les avoir décollées et individualisées. Les résultats des révélations par immunoempreinte ont été identiques dans les deux conditions.

VI-4-Modifications des protéines des micronèmes lors de l'invasion

Lorsque des immunoprécipitations sont réalisées avec les sérums anti 421 sur les lysats de tachyzoïtes purifiés de *Toxoplasma gondii* marqués pendant 1 heure en milieu extracellulaire ou 6 heures en intracellulaire, sur les lysats des tachyzoïtes remis en culture pour envahir de nouvelles cellules Véro après leur marquage (extra ou intracellulaire) et qui n'ont pas pénétré, ou bien sur les lysats des tapis cellulaires infestés par ces tachyzoïtes marqués, les sérums immunoprécipitent dans tous les cas une seule bande de 50 kDa (après analyse électrophorétique en conditions nos réductrices) (Pl. VIII, fig. A).

Les immunoprécipitations réalisées avec l'AcMc T4 2F3 sur chacun de ces lysats montrent également les même profils, qui sont identiques à celui de l'immunoprécipitation

réalisée sur un lysat de marquage métabolique long des tachyzoïtes intracellulaires. Toutefois, le profil de l'immunoprécipitation à partir du lysat des tachyzoïtes du marquage de 1 heure en milieu acellulaire rappelle celui du marquage court des tachyzoïtes intracellulaires, avec des bandes de 98 et 40 kDa d'intensité égale respectivement à celles de 90 et 38 kDa (Pl. VIII, fig. B).

L'AcMc T3 4A11 immunoprécipite une seule bande de 120 kDa à partir des lysats des tachyzoïtes purifiés qui sont marqués soit en milieu acellulaire soit en intracellulaire. Il immunoprécipite également la même bande à partir des lysats des tachyzoïtes marqués puis remis sur des cellules Véro et qui ne les ont pas pénétrées. A partir des lysats des cellules Véro infestées par les tachyzoïtes marqués (en milieu extracellulaire ou en milieu intracellulaire), l'AcMc T3 4A11 immunoprécipite 3 bandes de 120, 116 et 110 kDa d'intensités égales (Pl. VIII, fig. C).

DISCUSSION

Le contenu des micronèmes chez *Toxoplasma gondii* n'avait jusqu'à présent pas été caractérisé. Au niveau des granules denses, plusieurs protéines avaient été décrites. Nous rapportons dans le présent travail l'identification d'une protéine du conoïde, de trois protéines contenues dans les micronèmes, d'une nouvelle protéine des granules denses, ainsi que d'autres caractéristiques originales des constituants de ces organites. Nous discutons donc d'abord ces résultats, puis analyserons certaines propriétés relatives aux différentes étapes de l'interaction parasite–cellule hôte dans lesquelles ces organites sont impliqués.

I–CARACTERISATION D'UNE PROTEINE DU CONOIDE

Parmi les anticorps qui réagissent avec l'extrémité apicale, nous avons isolé un AcMc qui réagit avec le conoïde. Nous avons ainsi localisé une protéine de 80 kDa qui est identifiée pour la première fois au niveau de cet organite sur lequel peu de données sont rapportées dans la littérature. Cet AcMc doit reconnaître un épitope de type conformationnel ce qui justifierait sa non réactivité sur le lysat de parasites réduit. La réduction par le dithiotreithol entraînerait une dénaturation juste suffisante pour abolir la conformation de l'épitope, mais qui est sans conséquence sur la migration de la protéine en SDS–PAGE. En effet, la protéine migre toujours à 80 kDa comme nous l'avons constaté sur les éluats réduits de l'anticorps après les immunoprécipitations réalisées sur les lysats des tachyzoïtes marqués métaboliquement en présence de précurseurs radioactifs. Cette protéine est identifiée dans le culot et non dans le surnageant obtenus après la lyse des tachyzoïtes par congélations/decongélations. Les essais d'immunoprécipitation après la lyse des cellules marquées avec un tampon à base de NP40 n'ont pas permis de révéler la bande de 80 kDa sur l'éluat de l'AcMc T4 2F6. La liaison de cette protéine au cytosquelette paraît donc vraisemblable.

Les études de biosynthèse ont d'autre part montré que cette protéine subit des transformations post traductionnelles. Elle dérive d'un précurseur de 84 kDa et elle incorpore la glucosamine et le mannose. La transformation post traductionnelle à partir de précurseurs de plus haut poids moléculaire est comparable à celle que subissent certraines protéines des rhoptries de *Toxoplasma gondii* (Sadak *et al.*; 1988) ou la protéine de 225 kDa des pédoncules des rhoptries de *Plasmodium falciparum* (Roger *et al.*, 1988).

Cette protéine de 80 kDa est distincte de l'actine, qui est la seule protéine localisée, jusqu'à présent, au niveau du conoïde et dont le poids moléculaire est d'environ 47 kDa (Yasuda *et al.*, 1988). L'actine a été montré associée à toutes les structures qui constituent le cytosquelette, et la localisation simultanée de la myosine dans cette région apicale (Schwartzman et Pfefferkorn, 1983), a suggéré une implication dans la motilité des zoïtes. L'actine a été rapprochée de l'antigène conservé, identifié chez plusieurs espèces d'Apicomplexa dont *Toxoplasma gondii* (Taylor *et al.*, 1990). La conservation d'un tel antigène dans la même région chez toutes les espèces du phylum aurait un rapport avec la propriété qui les regroupe tous, à savoir le même processus d'invasion.

Par manque de données expérimentales supplémentaires, et de données sur le conoïde dans la littérature, nous ne pouvons suggérer aucune fonction pour cette protéine de 80 kDa que nous avons identifiée au niveau du conoïde de *Toxoplasma gondii*.

II-CARACTERISATION DES MICRONEMES

Les sondes anticorps produisant une fluorescence polaire réagissent avec des organites de la région apicale. La localisation du marquage dans la région apicale est montrée clairement sur les tachyzoïtes intracellulaires où il se situe sur la partie des tachyzoïtes situées à la périphérie des rosettes. Nons rappelons que l'étude ultrastructurale des parasites intracellulaires

montre en effet que la partie apicale des tachyzoïtes est orientée vers la périphérie. Au cours de la division des tachyzoïtes par endodyogénie, les cellules filles se forment à l'intérieur de la cellule mère et la séparation commence à partir de l'apex et se termine vers l'extrémité postérieure. La reprise de la division par chaque nouvelle cellule aboutit à la formation d'une rosette où les scissions entre les cellules filles s'opèrent de l'extérieur vers le centre. Parfois, suite à une anomalie de division, il est possible d'observer des tachyzoïtes (jusqu'à quatre à la fois) encore liés par leur pôle postérieur. La fluorescence apicale observée, diffère de celles produites par les anticorps spécifiques des rhoptries (Sadak *et al.*, 1988) ou des granules denses.

Le marquage correspondant sur les coupes ultrafines de tachyzoïtes ou bradyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, est situé sur les sections des micronèmes. Aucun autre organite n'est marqué de façon significative. Toutes les sections des micronèmes ne sont pourtant pas marquées, ceci pouvant être du à la sensibilité moindre de la technique d'immunolocalisation ultrastructurale par rapport à celle de l'immunofluorescence. Ces organites sont de très petite taille (environ 30x150 nm), on peut avancer une autre explication en conséquence de l'absence de marquage sur de nombreux micronèmes: lors de l'immunolocalisation ultrastructurale, une partie seulement des organites est exposée aux anticorps car leur épaisseur est bien inférieure à celle de la coupe (qui est elle-même de 80 à 100 nm). Une dernière possibilité ne peut être exclue: l'hétérogénéité du marquage pourrait être occasionnée par une hétérogénéité de la population des micronèmes.

II-1-Composition du contenu des micronèmes

Trois molécules ont été identifiées dans les micronèmes de *Toxoplasma gondii* grâce à des sondes spécifiques. Nous les avons désignées par:

-Mic 1: la molécule de 60 kDa, pHi 6.5 identifiée par les sérums de lapin et souris immunisés par la protéine recombinante 421

-Mic 2: la molécule de 120 kDa, pHi 5 identifiée par les AcMc III3E10 et T3 4A11

-Mic 3: la molécule de 90 kDa, pHi 6,75 identifiée par l'AcMc T4 2F3.

La désignation par Mic est une standardisation pour les molécules localisées au niveau des micronèmes comme Sag, Rop et Gra désignent respectivement celles de la surface, les rhoptries et les granules denses de *Toxoplasma gondii* (Sibley et Boothroyd, soumis; Leriche et Dubremetz, 1991).

Les molécules des micronèmes incorporent toutes les trois les acides aminés lors des marquages métaboliques des tachyzoïtes. Leur nature protéique est ainsi confirmée. Elles incorporent également de la glucosamine. Toutefois, Mic 1 semble être beaucoup plus glycosylée que Mic 2 et Mic 3. Les incubations en présence des acides gras ne montrent par contre aucune incorporation de ces précurseurs.

Mic 2 est très soluble; Mic 3 est peu soluble et est retrouvé dans le culot du lysat de tachyzoïtes, alors que Mic 1 est identifiée dans les deux fractions mais en quantité plus importante dans la fraction soluble. L'analyse a été réalisée après une centrifugation de 30 mn à 10000g dans laquelle la séparation soluble/insoluble n'est pas parfaite (c'est pourquoi nous parlons plutôt de surnageant et culot du lysat). Mic 3 serait donc plus liée à des structures membranaires que Mic 1 et surtout que Mic 2 soluble. L'insolubilisation de Mic 3 pourrait aussi être due à des interactions électrostatiques entre les chaînes protéiques comme ceci a été suggéré pour Rop 1 (Ossorio *et al.*, sous presse)

Mic 1 migre à 60 kDa sous les conditions réductrices d'électrophorèse, alors qu'elle migre plus loin (à 50 kDa) quand elle ne subit pas de réduction. Cette différence migratoire entre les deux conditions indique l'existence de ponts disulfures intrachaînes déjà rencontrés dans les protéines de 41, 35 et 30 kDa de la surface de *Toxoplasma gondii* (Couvreur *et al.*, 1988).

Mic 3 passe de 90 à 38 kDa après réduction, par le DTT, des lysats de tachyzoïtes ou des éluats de l'AcMc correspondant. En immunoblot ou sur l'éluat de l'AcMc T4 2F3 après électrophorèse bidimensionnelle, deux protéines de 38 kDa apparaissent aux Pi 6,7 et 6,75. Il s'agit donc vraisemblablement là d'un hétérodimère formé de deux protéines isoformes de 38 kDa dont les précurseurs sont de 40 kDa et qui sont liées par des ponts disulfures. Les micronèmes de *Sarcocystis tenella* possèdent aussi une protéine dimèrique (Dubremetz et Dissous, 1980; J.F. Dubremetz, communication personnelle); il s'agit d'un hétérodimère mais qui est formé de deux protéines de 20 et 22 kDa qui possèdent des épitopes communs (Pohl *et al.*, 1989). Par ailleurs, parmi les trois protéines des micronèmes, Mic 3 est la seule à montrer une transformation post traductionnelle révélée lors des essais de marquage court-chasse. La transformation des précurseurs de 40 kDa pour donner les produits finaux ou les molécules fonctionnelles de 38 kDa, pourrait correspondre à une maturation nécessitant un clivage protéolytique pour cette protéine comme chez certaines protéines de rhoptries de *Toxoplasma gondii* (Sadak *et al.*, 1988) ou de *Plasmodium falciparum* (Roger *et al.*, 1988). De plus, le fait que Mic 3 est la seule à subir une telle transformation, la protéase au niveau de l'organite, qui assure sa maturation, doit lui être spécifique.

Lors du développement intracellulaire, Mic 2 est synthétisée avec un poids moléculaire de 120 kDa et ne subit pas de transformation post traductionnelle modifiant sa taille. Ceci est

suggéré par l'immunoprécipitation d'une seule bande avec les AcMc III 3E10 et T3 4A11 sur le lysat de marquage court de 6 minutes, identique à celle observée lors du marquage court suivi d'une chasse allant jusqu'à 2 heures. Après un marquage long de 6 heures, et tant que les tachyzoïtes restent intracellulaires et qu'il n'y a pas de processus d'invasion, seule la bande de 120 kDa est obtenue en immunoprécipitation. Les bandes de 116 et 110 kDa n'apparaissent que lorsqu'une réinvasion peut avoir lieu. Nous pouvons ainsi expliquer l'apparition des bandes 116 et 110 kDa sur les immunoempreintes réalisées avec les AcMc T3 4A11 et III3E10. Les lysats utilisés pour réaliser les immunoempreintes le sont à partir de tachyzoïtes d'entretien prélevés *in vivo* ou *in vitro* toujours après le développement intracellulaire massif des parasites. Les préparations contiennent donc en général des parasites ayant récemment pénétré les cellules hôtes.

Les études ultrastructurales ne permettent pas à elles seules la description fine des différents compartiments d'un organisme. Quoique l'existence des micronèmes chez *Toxoplasma gondii* ait été rapportée il y a nombre d'années (Gustafson *et al.*, 1954; Jacobs, 1967), ces organites ont été confondus avec les sections des pédoncules des rhoptries ou pris pour leurs précurseurs (Vivier et Petitprez, 1972). La combinaison de l'ultrastructure et de l'immunodétection à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux monospécifiques permet maintenant de mieux les caractériser. Ainsi, la différence entre les micronèmes et les autres organites est établie chez *Toxoplasma gondii*, comme nous la décrivons dans le présent travail par la localisation exclusive de certains composants dans les micronèmes. Chez *Toxoplasma gondii*, nous avons identifié trois molécules distinctes et ne présentant pas de réactions croisées. Toutefois, Mic 1, 2 et 3 pourraient ne pas être les seules composantes des micronèmes de *Toxoplasma gondii*. L'existence des micronèmes en faible proportion chez les tachyzoïtes rend difficile leur purification et l'inventaire de leur composition. Ces organites

sont certes plus nombreux au stade bradyzoïte, mais dans ce cas le facteur limitant pour un fractionnement subcellulaire est la quantité de parasites que l'on peut obtenir. Chez les autres espèces d'Apicomplexa, l'individualité des micronèmes a été également rapportée, (Fine *et al.*, 1984; Cochrane *et al.*, 1989; Torii *et al.*, 1989a; Adams *et al.*, 1990; Iams *et al.*, 1990; Bonnin *et al.*, 1991; Entzeroth *et al.*, 1991). Le fractionnement subcellulaire des parasites a aidé à la caractérisation de leur contenu, mais les fractions des micronèmes chez *Sarcocystis tenella* (Dubremetz et Dissous, 1980), *Sarcocystis muris* (Pohl *et al.*, 1989) *Eimeria nieschulzi* (Dubremetz *et al.*, 1989) et chez *Eimeria tenella* (Tomley *et al.*, 1991) n'ont montré qu'un nombre limité de protéines majeures.

II-2-Rôle des micronèmes dans l'interaction parasite-cellule hôte

Aucune réaction n'est décelée avec les cellules hôtes infectées par les moyens de marquage utilisés. Nous ne pouvons alors comparer nos résultats avec ceux de Torii *et al.* (1989a), Entzeroth *et al.*, (1991) ou Bonnin *et al.* (1991) qui ont repéré des molécules de micronèmes respectivement de *Plasmodium brasilianum*, de *Sarcocystis muris* et de *Cryptosporidium parvum* sur des structures membranaires des cellules hôtes ou à l'intérieur des vacuoles parasitophores. La diffusion du marquage sous forme de fluorescence autour de tachyzoïtes intracellulaires en division pourrait être interprétée comme la diffusion du contenu des micronèmes qui entreraient dans la composition du réseau tubulo-membranaire dans la vacuole parasitophore. Mais aucune confirmation n'est fournie par l'immunolocalisation, peut-être à cause de la sensibilité moindre de la technique. Nous avons pu repérer cependant un marquage sur les micronèmes en formation dans les cellules filles. D'après leur localisation, nous pouvons considérer que la diffusion du marquage en fluorescence autour des tachyzoïtes intracellulaires et en arrière de la région apicale, correspond sans doute au marquage de ces

micronèmes en formation dans les cellules filles et non à un matériel excrété en dehors du parasite.

Mic 3 est repérée au niveau de la paroi des kystes mais pas au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore. Sa translocation depuis les micronèmes n'a pas été identifiée: à aucun moment nous n'avons localisé cette protéine dans la vacuole parasitophore. Nous n'avons pas réalisé d'immunodétection sur les différents stades de la formation des kystes. La formation de la paroi kystique se fait à partir de la transformation de la membrane de la vacuole parasitophore et des apports de matériaux provenant de la cellule hôte et du parasite (Ferguson et Hutchison, 1987). Mic 3 pourrait être une des composantes parasitaires de la paroi kystique. Une observation curieuse est que le sérum du lapin immunisé par Mic 3 purifiée réagit avec les micronèmes mais également avec les rhoptries. Ce sérum fournit cependant le même profil sur immunoélectrotransfert que l'AcMc qui a servi à purifier la protéine. Mic 3 pourait possèder un épitope commun avec une protéine de rhoptrie. Cependant, comme aucune bande additionnelle n'est observée en immunoempreinte, cette hypothèse est peu probable. La réactivité d'un anticorps polyclonal est multiépitopique comparée à celle d'un anticorps monoclonal. Ceci pourrait expliquer l'identification de Mic 3 au niveau des rhoptries: la molécule pourrait transiter par les rhoptries et y être modifiée avant une éventuelle exocytose. Dans ce cas, l'AcMc ne peut alors la reconnaître en dehors des tachyzoïtes.

La révélation de Mic 1 sur les cellules Véro et MRC5 incubées avec le surnageant du lysat des tachyzoïtes, par immunofluorescence indirecte et par immunoempreinte, indique une affinité de la protéine pour la membrane plasmique des cellules. Avec le sérum du lapin anti tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, nous avons révélé par immunoempreinte la fixation de certaines molécules du surnageant du lysat des tachyzoïtes sur les cellules incubées en sa

présence. Une des principales doit correspondre à celle identifiée par les sérums anti 421. Mic 1 présente des variations dans la migration en fonction des conditions de réduction pendant l'électrophorèse, ces variations sont retrouvées après l'analyse effectuée sur le lysat des cellules incubées avec le surnageant. La bande majeure reconnue par le sérum du lapin anti tachyzoïtes et qui comigre avec Mic 1, subit les mêmes variations. Toutes les bandes reconnues par ce sérum polyspécifique dans le surnageant ne sont pas révélées sur les cellules incubées, ce qui indique que toutes les protéines de cette fraction soluble ne possèdent pas cette propriété d'affinité membranaire. Mic 2 par exemple, est très soluble mais ne se fixe pas sur les cellules incubées. La fixation de Mic 1 sur la membranes des cellules incubées est démontrée par sa révélation à l'aide du sérum du lapin polyclonal et par les sérums qui lui sont spécifiques. Mic 1, provenant d'un organite du complexe apical, pourrait donc être, chez *Toxoplasma gondii*, une des composantes parasitaires intervenant dans les processus de reconnaissance et d'attachement à la la cellule hôte, étape initiant le phénomène d'invasion.

Chez les autres Apicomplexa, le rôle des micronèmes dans les phènomènes d'attachement, en raison des propriétés d'affinité membranaire de leurs protéines, sont fortement suggérées. Les récepteurs pour les protéines des antigènes Duffy ont été localisés dans les micronèmes de *Plasmodium knowlesi* (Adams *et al.*, 1990). D'autres protéines des micronèmes de *Plasmodium brasilianum* (Torii *et al.*, 1989a) et de *Sarcocystis muris* (Entzeroth *et al.*, 1991), qui ont été localisées sur les membranes plasmiques des cellules hôtes après l'invasion, poussent ces auteurs à postuler l'hypothèse d'une fixation lors de la pénétration du parasite dans la cellule hôte. L'analyse de la séquence d'une protéine des micronèmes de *Eimeria tenella* montre l'existence de domaines à proprités adhésives et qui seraient, d'après Tomley *et al.* (1991), utilisés par le parasite dans ses interactions avec les cellules hôtes.

Les résultats de l'étude des modifications des protéines lors de l'invasion ne montrent pas d'altérations des protéines Mic 1 et Mic 3. Par contre, Mic 2 diminue d'intensité et des bandes de 110 et 116 kDa apparaissent sur le profil des immunoprécipitations effectuées sur les lysats des tapis cellulaires infestés par les tachyzoïtes qui ont été marqués en milieu intra ou extracellulaire. De telles transformations ne se déroulent pas chez les tachyzoïtes qui n'ont pas pénétré les cellules Véro pendant l'incubation. Les modifications affectant Mic 2 semblent donc être en relation directe avec l'invasion, mais la nature de cette relation n'est pas connue. Ces modifications consistent probablement en l'intervention de protéases spécifiques produisant les molécules de 116 et 110 kDa. Ces protéases pourraient provenir des cellules Véro, car nous avons effectué les immunoprécipitations à partir des lysats des tapis cellulaires infestés, alors que les lysats des tachyzoïtes, n'ayant pas envahi, ne contiennent pas de protéines cellulaires. Il s'agirait alors d'une protéolyse artéfactuelle liée à la lyse. Cependant, lorsque des tapis cellulaires infestés sont lysés après marquage métabolique des tachyzoïtes intracellulaires, on n'immunoprécipite que la bande de 120 kDa. Il semble donc que ces modifications soient liées à l'invasion. Une maturation similaire de protéines des micronèmes à été décrite chez *Plasmodium knowlesi*, où des protéines de 148 et 145 kDa sont converties en protéines solubles de 138 et 135 kDa. Ce sont ces protéines qui vont se fixer sur les globules rouges du singe Rhésus ou sur les antigènes Duffy des globules rouges humaines (Adams *et al.*, 1990).

Les AcMc qui réagissent avec les micronèmes de *Plasmodium brasilianum* et qui repèrent des protéines dans différents compartiments des cellules hôtes, identifient également des protéines qui se présentent sous formes de complexes, pouvant résulter d'une protéolyse (18–16–14 kDa; 30–29–27–26 kDa et 137–122 kDa; Torii *et al.* 1989a). Chez *Eimeria tenella* également, des protéines des micronèmes se présentent sous forme de complexe (Tomley *et al.*, 1991). Aucune étude cinétique n'a été réalisée sur ces protéines et il n'est donc pas

possible, dans ces derniers cas, de lier l'existence de ces protéines sous forme de complexe à des transformation relatives à l'invasion.

II-3-Exocytose des micronèmes

Utilisant les sondes anti micronèmes, nous n'avons remarqué aucune différence dans l'intensité du marquage (imunofluorescence indirecte ou immunolocalisation par des grains d'or colloïdal) entre les tachyzoïtes extracellulaires et les tachyzoïtes qui sont en invasion ou qui viennent d'envahir des cellules hôtes ou les stades intracellulaires en division. La fluorescence des apex des tachyzoïtes ou le marquage par les grains d'or colloïdal des sections des micronèmes ne montrent aucune diminution dans l'intensité de la réactivité d'un stade par rapport à un autre. Il n'y a pas de disparition complète de ces organites après l'invasion, et d'ailleurs sur les images de microscopie électronique aucune diminution ne peut être appréciée contrairement à ce qui est décrit chez *Plasmodium knowlesi* (Bannister, 1977). Si des constituants de ces organites sont exocytés pour participer dans les processus de l'invasion, les micronèmes du zoïte ne sont alors pas utilisés en totalité pour cette étape. En d'autres termes, les micronèmes seraient comme les rhoptries qui existent au nombre d'une dizaine mais ne sont pas toutes utilisées par le zoïte pour envahir la cellule hôte.

Il n'y a aucune donnée jusqu'à présent concernant les modalités de l'exocytose postulée pour les micronèmes. L'existence de ce phénomène est pourtant évoquée par des immunolocalisations de certaines protéines de ces organites dans les cellules hôtes. Chez *Toxoplasma gondii* nous n'avons pas révélé de protéines des micronèmes dans les cellules hôtes, mais dans le cas de Mic 1 qui a une affinité membranaire et pourrait ainsi être impliquée dans l'attachement, ou Mic 2 qui subit des modifications strictement liées à l'invasion, une exocytose à ce stade de l'interaction paraît vraisemblable. Des protéines des rhoptries semblent intervenir également à ce stade: l'exocytose de ces organites a été

démontrée de façon évidente par des images de microscopie électronique et par la localisation d'une protéine de 60 kDa sur le membrane de la vacuole parasitophore à la fin de l'invasion (Kimata et Tanabe, 1987; Leriche, 1989; Saffer *et al.*, sous presse). Si à ce stade de l'interaction des protéines des rhoptries et des micronèmes interviennent simultanément, on peut envisager une exocytose simultanée des deux types d'organites. Une fusion préalable entre les deux peut également être envisagée comme l'ont suggéré plusieurs auteurs (Entzeroth *et al.*, 1991). La localisation de Mic 3 dans les rhoptries avant son éventuelle exocytose irait également dans ce sens.

Les récepteurs des protéines du gène Duffy de *Plasmodium knowlesi* ne sont pas localisés sur la surface des parasites. Leur libération à partir des micronèmes s'effectuerait peut-être après l'attachement et la réorientation pour induire la formation de la jonction mobile chez les érythrocytes Duffy-positifs (Adams *et al.*, 1990). Une telle stratégie d'exocytose pour toutes les molécules provenant des organites du complexe apical (excepté un rôle au niveau de la reconnaissance initiale) peut être envisagée. Ces protéines seraient plutôt des enzymes à activité protéasique ou phospholipasique et agiraient sur la membrane de la cellules hôte pour induire son invagination. Ou bien, dans le cas de l'hypothèse de la néoformation de la membrane de la vacuole parasitophore, ces molécules seraient des constituants qui participeraient à cette formation.

II-4-Division des tachyzoïtes et formation des micronèmes

Lors des observations effectuées au microscope électronique sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes isolés, nous avons repéré plusieurs formes en division. Nous avons également immunoprécipité des protéines de micronèmes radiomarquées après incubation des tachyzoïtes pendant 1 heure en milieu acellulaire en présence de précurseurs radioactifs. Les transformations de Mic 2 observées uniquement chez les tachyzoïtes qui réussissent à envahir

les cellules hôtes suggèrent que cette protéine pourrait être utilisée par les tachyzoïtes au cours de l'invasion. Ces modifications ont été mises en évidence sur les protéines radiomarquées, c'est à dire sur les protéines qui ont été synthétisées durant l'heure d'incubation en présence des précurseurs radiomarqués.

Dans la littérature, la division en milieu extracellulaire de *Toxoplasma gondii* et des autres Apicomplexa n'a jamais été rapportée. Ces protozoaires sont des parasites intracellulaires obligatoires et les étapes de leur développement n'ont été décrites qu'au sein de leurs cellules hôtes. D'autre part, la formation des organites, se ferait au cours de la formation des cellules filles et le contenu de ces organites serait stocké après sa synthèse dans les organites en formation.

Les tachyzoïtes isolés, sur lesquels nous avons réalisé les observations au microscope électronique, sont libérés de cellules hôtes éclatées au moment où elles ne peuvent plus contenir ces parasites qui se sont massivement multipliés. Les formes libres en division pourraient être des individus qui avaient entamé l'endodyogénie juste avant l'éclatement de la cellule hôte et qui la poursuivent après la réinvasion d'une nouvelle cellule hôte. Mais les résultats du marquage métabolique montrent une activité métabolique possible pour les tachyzoïtes dans un milieu acellulaire. Et le fait que la maturation de Mic 2, relative au phénomène d'invasion, ait pu être mise en évidence sur des protéines qui ont été synthétisées dans l'heure qui précède l'incubation, pourrait signifier que les tachyzoïtes utilisent ces protéines nouvellement synthétisées pour l'invasion de nouvelles cellules hôtes.

S'il n'y a pas de division extracellulaire des tachyzoïtes, l'utilisation de telles protéines nouvellement formées signifierait qu'après leur synthèse, ces protéines sont acheminées dans des organites préexistants. Ces organites participent également au processus de l'invasion des cellules hôtes.

Si la formation des organites est simultanée à la synthèse de leur contenu, dans ce cas, la division des tachyzoïtes serait très fortement suggérée, puisqu'il s'agirait du contenu des organites des cellules filles qui se seraient formées lors de l'incubation en milieu extracellulaire et qui seraient parvenues à envahir les cellules Véro au moment de la remise en culture. Les transformations mises en évidences sur Mic 2 intéresseraient les protéines des micronèmes des cellules filles.

Ce phénomène de division extracellulaire reste donc à élucider.

III-CARACTERISATION DES GRANULES DENSES

La fluorescence en spots intracytoplasmiques est directement superposable à la répartition des granules denses dans la masse cytoplasmique. Le marquage correspondant en immunolocalisation ultrastructurale est très démonstratif: toute les sections des granules denses sur les tachyzoïtes et les bradyzoïtes réagissent avec les sondes qui offrent cette image de fluorescence. Aucune hétérogénéité de population n'est décelée au sein des granules denses d'un même zoïte. Les doubles marquages, avec la combinaison de différentes sondes, montrent toujours une réactivité identique de toutes les sections des granules denses. Le contenu a aussi une répartition homogène sur toute les sections de ces organites. Aucun marquage supplémentaire de la paroi des zoïtes n'est observé avec aucune de ces sondes comme c'est le cas pour les AcMc TG17-179 et TG17-113 de Charif *et al.* (1990) qui reconnaissent simultanément les granules denses et la paroi des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*.

III-1-Contenu des granules denses

Quatre molécules de granules denses sont étudiées, trois d'entre elles ont été déjà décrites partiellement. Nous les désignons par:

-Gra 1: la molécule de 27 kDa, pHi 4,9 identifiée par l'AcMc T5 2B4 (Leriche et Dubremetz, 1990), elle est identique à celle de 23 kDa décrite, clonée et séquencée par Cesbron-Delauw *et al.* (1989) et à celle de 27 kDa identifiée par l'AcMc TG 17-43 (Charif *et al.*, 1990).

-Gra 2: la molécule de 28 kDa pHi 7,8 identifiée par l'AcMc T4 1F5 (Leriche et Dubremetz, 1991) serait identique à la protéine de 28,5 reconnue par l'AcMc TG 17-42, décrite par Charif *et al.* (1990) et clonée par Prince *et al.* (1989). La comparaison sur le même lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* des immunoempreintes produites par les AcMc T4 1F5 et TG 17-179 a montré la comigration des bandes correspondant aux anticorps. De plus, l'AcMc T4 1F5 réagit positivement avec la protéine recombinante correspondant à Gra 2 (S. Parmley, communication personnelle).

-Gra 3: la molécule de 30 kDa (pHi indéterminé) identifiée par l'AcMc T6 2H11 décrite par Leriche et Dubremetz (1991).

-La quatrième molécule de granules denses découverte au cours de ce travail est Gra 4: la molécule de 40 kDa (pHi indéterminé) identifiée par les sérums anti 205 et l'AcMc T9 4B9.

La nature protéique des molécules identifiées au niveau des granules denses est également déduite des incorporations des acides aminés radiomarqués. Gra 1 est la première protéine des granules denses dont le clonage et le séquencage du gène correspondant ont été réalisés (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989). Les transformations post traductionnelles ne sont pourtant pas déterminées.

L'AcMc T4 1F5 qui identifie Gra 2, réagit également avec une protéine de 70 kDa. L'AcMc TG 17-179 de Charif *et al.* (1990) réagit lui aussi avec Gra 2 mais pas avec la

protéine de 70 kDa; par ailleurs, en immunofluorescence et immunolocalisation, il réagit non seulement avec les granules denses mais en plus avec la pellicule des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Ces deux AcMc pourraient être dirigés contre des épitopes différents de Gra 2. L'épitope reconnu par l'AcMc T4 1F5 pourrait se trouver sur la protéine de 70 kDa mais il n'est pas connu si cet épitope est de type conformationnel ou de type séquentiel. Cette protéine de 70 kDa n'est pas une composante des granules denses, elle ne figure pas sur le profil de la fraction rhoptries–granules denses purifiée après fractionnement cellulaire (Leriche et Dubremetz, 1991) et aucune relation métabolique avec Gra 2 n'apparaît lors de l'étude des transformations métaboliques. Certains résultats expérimentaux (Fourmaux et Dubremetz, communication personnelle) suggèrent qu'il s'agirait d'une protéine de choc thermique. Elle est présente dans les cellules hôtes comme le montrent les résultats de l'immunoblot et elle est également identifiée sur les parasites purifiés. Mais il est cependant impossible de dire si cette protéine existe dans les tachyzoïtes ou si sa révélation ne résulterait pas seulement d'une contamination cellulaire de la fraction tachyzoïtes purifiées. La glycosylation de Gra 2 est fortement suggérée ici par l'incorporation de la glucosamine tritiée. Ce résultat confirme d'une part celui de Charif *et al.* (1990) qui ont décrit la fixation de la Concavaline A sur cette protéine, et d'autre part, il peut être corrélé avec la détermination de deux sites de N–glycosylation potentiels sur la séquence publiée par Prince *et al.* (1989). Nos résultats sur les transformations postraductionnelles montrent également que Gra 2 dérive d'un précurseur de plus bas poids moléculaire, ce qui va dans le sens d'une glycosylation post–traductionnelle.

Gra 3 ne montre pas d'incorporation de glucosamine tritiée quoiqu'elle dérive aussi d'un précurseur de plus bas poids moléculaire selon nos résultats de l'étude de la transformation post traductionnelle. Elle ne montre pas non plus d'acylation tout comme les autres molécules de granules denses.

Selon les résultats des immunolocalisations, Gra 2 et Gra 3 sont des protéines qui sont destinées à être excrétées dans la vacuole parasitophore comme toutes les autres protéines des granules denses. Elles ont été identifiées en proportion majeure dans la fraction rhoptries–granules denses (Leriche et Dubremetz, 1991), et dans le lysat total de tachyzoïtes, elle sont majoritaires par rapport à leur précurseurs respectifs. Leur maturation doit se passer donc au niveau de la biosynthèse des granules denses et non après leur exocytose.

Gra 4 se présente sous forme d'un doublet 40–41 kDa. L'incubation en présence de glucosamine tritiée a montré l'incorporation de ce composé uniquement dans la protéine de 41 kDa. D'autre part le séquencage du gène qui code pour la protéine et qui existe en copie unique dans le génome du tachyzoïte, a révélé l'existence d'un seul site potentiel de N–glycosylation, situé du coté N–terminal de la protéine (Mevelec *et al.*, soumis). Nous n'avons pas pu établir la cinétique de la biosynthèse de Gra 4, les immunoprécipitations à partir des lysats des marquages courts de 6 ou 15 mn, des chasses et des marquages de 4 ou 6 heures donnent toujours le même profil, avec le doublet de 40–41 kDa. La révélation de Gra 4 sous forme de doublet pourrait être expliquée par son existence sous deux formes différentes dont l'une ne serait pas glycosylée.

Les granules denses contiennent sans doute d'autres molécules telles que celles de 21 kDa (Charif *et al.*, 1990) et de 32 kDa (Sibley et Krahenbuhl, 1988) différente de Gra 3. En effet, la comparaison des immunoempreintes des AcMc correspondant à Gra 3 et la protéine de 32 kDa sur un même lysat de *Toxoplasma gondii* a montré qu'il s'agit de deux molécules différentes (D. Sibley, communication personnelle). Ces organites chez *Toxoplasma gondii* sont donc très complexes. Il n'existe pas d'inventaire des contenus des granules denses chez les autres espèces d'Apicomplexa et jusqu'à présents peu de protéines sont décrites dans ces

organites. Le fractionnement subcellulaire, utilisé pour la caractérisation des organites de ces parasites, n'avait montré qu'une bande majeure de 42 kDa dans la fraction purifiée des granules denses et qui est un composé majeur de l'ensemble du lysat parasitaire chez *Sarcocystis tenella* (Dubremetz et Dissous, 1980) et une bande majeure de 21 kDa dans la fraction des granules denses de *Sarcocystis muris* (Entzeroth *et al.*, 1986).

III-2-Exocytose des granules denses à la fin de l'invasion

Les micrographies de la fin de l'invasion des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* montrent la décharge d'un matériel amorphe et dense aux électrons. Les vésicules en cours de décharge sont principalement situées dans la région apicale, latéralement, au niveau d'une interruption du complexe membranaire interne où le plasmalemme est en continuité avec la membrane de ces vésicules. Ces sites d'exocytose sont distincts de celui des rhoptries qui est situé à l'extrémité apicale des tachyzoïtes. Les immunolocalisations réalisées sur des coupes de cultures cellulaires fixées au même stade d'infestation par les tachyzoïtes, avec les sondes dirigées contre Gra 1, 2, 3 et 4, nous ont permis de démontrer que ce matériel est identique au contenu des granules denses et qu'il s'agit donc bien de l'exocytose de ces organites. Toutes les composantes des granules denses doivent normalement se retrouver dans la vacuole parasitophore puisque c'est tout le contenu de ces organites qui y est libéré.

A ce stade, la membrane de la vacuole parasitophore qui vient de se former est encore appliquée contre le tachyzoïte. Le matériel déchargé fait décoller la membrane de la vacuole parasitophore au niveau du site de l'exocytose et s'étale dans l'espace ainsi formé. Cette décharge aboutit à un aggrandissement de l'espace vacuolaire comme on peut le noter sur les images des stades plus avancés.

L'exocytose des granules denses a été suggérée comme étant continuelle et serait en partie à l'origine des antigènes d'excrétion-secrétion (Darcy *et al.*, 1988). Les résultats que

nous avons obtenus sont comparables à ceux de Entzeroth (1985) puis Entzeroth et *et al.* (1986) concernant l'exocytose des granules denses de *Sarcocystis muris* dans la seconde vacuole parasitophore, de Torii *et al.* (1989) et Bannister *et al.* (1975) pour celles de *Plasmodium knowlesi* de Culvenor *et al.* (1991) pour celles de *Plasmodium falciparum* et de Shaw *et al.* (1991) pour celles de *Theileria parva*. Ce phénomène d'exocytose des granules denses, à ce stade précis de la fin de l'invasion paraît donc une caractéristique constante chez tous les Apicomplexa. Les mécanismes du déclenchement du phénomène ne sont pas connus, et il serait donc intéressant de déterminer les facteurs qui entrent en jeux à ce stade. Le calcium pourrait être un de ces facteurs. Sibley et Boothroyd (1991) suggèrent que le Ca^{++} à la concentration de 1 mM dans le milieu extracellulaire a un effet inhibiteur sur l'exocytose de Gra 2. Par la diminution de sa concentration (1 à 10 µM), ils ont pu démontrer une exocytose, ce qui les a conduit à suggérer que dans la vacuole nouvellement formée après l'invasion, l'abaissement de la concentration du Ca^{++} déclencherait l'exocytose des granules denses de *Toxoplasma gondii*.

Nos images montrent la fusion de la membrane des granules denses qui se déchargent avec le plasmalemme puis l'étalement du contenu déchargé directement en dehors du parasite sans communication avec le complexe membranaire interne. Cette modalité d'exocytose de ces organites paraît être identique chez tous les Apicomplexa. La suggestion d'une fusion des granules denses avec le complexe membranaire interne, préalable à l'exocytose, et qui aurait expliqué la détection de Gra 2 par Charif *et al.* (1990) dans le complexe membranaire interne paraît difficilement conciliable avec nos observations. La détection d'épitopes de protéines des granules denses au niveau de la pellicule pourrait résulter d'une réaction croisée entre protéines différentes.

III-3-Formation du réseau tubulo-membranaire de la vacuole parasitophore; destinée des différents constituants des granules denses

Le réseau tubulo-membranaire que l'on rencontre dans la vacuole parasitophore contenant des toxoplasmes en prolifération n'est pas observé immédiatement après l'invasion mais à des stades plus tardifs. Nous n'avons identifié ce réseau tubulaire que dans des vacuole parasitophore assez élargies: c'est à dire que la membrane de la vacuole parasitophore n'est plus directement appliquée contre le parasite. Par endroit, des connections entre ce réseau tubulo-membranaire et la membrane de la vacuole parasitophore sont évidentes. On peut observer des vésicules qui semblent venir fusionner avec la membrane de la vacuole parasitophore et il semble donc que l'agrandissement de cette membrane puisse résulter de ce phénomène.

Le réseau tubulaire a été le plus souvent observé initialement au niveau de poches formées à l'extrémité postérieure des tachyzoïtes. Le matériel amorphe, exocyté des granules denses, n'est plus rencontré à ce moment là et la surface des tachyzoïtes ne contient aucune trace de ce matériel. Nous avons mis en évidence une densification du complexe membranaire interne avec des interruptions et un réticulum endoplasmique bien développé à ce niveau postérieur. Le réticulum endoplasmique semble être lié au complexe membranaire interne. Ces éléments peuvent constituer un argument en faveur d'une activité excrétoire qui se déroulerait à cet endroit. Elle serait à l'origine du réseau tubulaire observé à partir de ce stade.

Le marquage des granules denses, et du réseau tubulaire, obtenu après les immunolocalisations réalisées avec les sondes anti granules denses sur des coupes de cultures cellulaires, fixées plusieurs heures après l'infestation (et après plusieurs divisions des tachyzoïtes intracellulaires), nous indique que les protéines Gra 1, 2 , 3 et 4 entrent dans la composition du réseau. Lors de la structuration du réseau tubulo-membranaire, il y aurait une intégration des protéines des granules denses à un moment donné puisque ces molécules sont

exocytées à la fin de l'invasion et avant l'apparition des structures tubulaires. Une autre possibilité, serait une structuration directe de ce même matériel amorphe qui serait entraîné par "capping" vers l'extrémité postérieure et qui donnerait naissance au réseau tubulaire. Les mécanismes intermédiaires et les processus de cette structuration au cours de ces phases restent à déterminer.

Toutes les protéines des granules denses décrites chez *Toxoplasma gondii* ont été détectées sur le réseau tubulo-membranaire (Sibley et Krahenbuhl, 1988; Cesbron-Delauw *et al.*, 1989; Charif *et al.*, 1990; Leriche et Dubremetz, 1990). Nichols et al (1983) postulent que le réseau tubulaire provient des rhoptries (d'après l'analogie avec ce qui reste dans les rhoptries vidées à la fin de l'invasion) et des membranes des parasites. Sibley *et al.* (1986) puis Sibley et Krahenbuhl (1988) postulent également que ce réseau serait en majorité formé à partir des protéines de surface. L'analyse de ces derniers auteurs a été faite après isolement du matériel adsorbé sur les parasites qu'ils ont interprété comme étant le réseau tubulaire de la vacuole parasitophore qui cosédimente avec les parasites après l'éclatement des cellules hôtes. Toutefois, l'analyse de la localisation de la P30 (la protéine majeure de la surface des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*) dans la vacuole parasitophore ne confirme pas sa présence dans le réseau tubulo-membranaire (J-F. Dubremetz, communication personnelle).

Avec l'AcMc T6 2H11 et le sérum anti Gra 3, nous avons localisé, sur les coupes des cultures fixées après plusieurs heures d'infestation par les tachyzoïtes, la protéine Gra 3 sur la membrane de la vacuole parasitophore. Les résultats des doubles marquages sont démonstratifs: de toutes les protéines des granules denses sur lesquelles nous avons travaillé, Gra 3 est la seule qui soit rencontrée à ce niveau. Comme cette protéine n'est pas localisée sur cette membrane de la vacuole parasitophore à la fin de l'invasion, mais seulement dans le

matériel exocyté au même titre que les autres protéines des granules denses, il est logique de penser qu'elle transite d'abord par la vacuole parasitophore avant d'aller se fixer ou s'intégrer, plus tard, à cette membrane. Gra 3 existe également sur la paroi des kystes qui renferment des bradyzoïtes. L'analogie entre la paroi kystique et la membrane de la vacuole parasitophore est concevable, puisque le kyste semble dériver de la transformation d'une vacuole parasitophore et sa paroi est en partie formée à partir de la membrane de la vacuole parasitophore.

Gra 3 est la seule parmi les protéines des granules denses identifiées à avoir une telle destinée. Pour s'associer avec la membrane de la vacuole parasitophore, Gra 3 devrait posséder des déterminants qui interagissent avec les molécules de cette membrane à la différence des autres protéines qui ne sont intégrées que dans le réseau tubulo–membranaire de la vacuole parasitophore. En d'autres termes, la capacité d'ancrage ou d'intégration dans la membrane de la vacuole parasitophore suppose l'existence d'un domaine adéquat au moment de sa synthèse ou de son excrétion, domaine régissant plus qu'une simple interaction hydrophobe, puisque le réseau intravacuolaire a aussi une structure membranaire. Plus de précisions sur la distribution spécifique de Gra 3, sa topologie et sa fonction potentielle, sont à attendre de la détermination de sa structure primaire après séquençage du gène codant correspondant.

III–4–Vacuole parasitophore, rôle du réseau tubulo–membranaire et de la membrane de la vacuole parasitophore

La sensiblilité de *Toxoplasma gondii* à l'acidification du milieu et aux produits toxiques de l'oxygène (Murray et Cohn, 1979; Hughes *et al.*, 1989), exige une protection des flux des protons et des radicaux libres à partir du cytoplasme de la cellule hôte vers le compartiment où se développe le parasite. Le compartiment qu'occupe le parasite est distinct des endosomes ou phagosomes formés dans la cellule hôte. Cette différence est démontrée par l'absence d'acidification, par l'impossibilité à fusionner avec les lysosomes et par la déficience de sa

membrane en certains marqueurs comme les glycoprotéines lysosomales (Sibley *et al.*, 1985b; Carvalho et de Souza, 1989, Joiner, 1990).

La détection des protéines des granules denses dans la vacuole parasitophore est en faveur de la participation et le contrôle par le parasite de l'édification de son site de développement. L'existence du réseau tubulo-membranaire dans la vacuole parasitophore contenant des toxoplasmes souligne la particularité du compartiment et pourrait expliquer sa compétence à s'isoler du trafic endosomal de la cellule hôte et à assurer la survie et le développement du parasite. Mais la fonction exacte de ce réseau tubulo-membranaire et des protéines parasitaires qui lui sont associées n'est pas connu.

La membrane de la vacuole parasitophore constitue une interface entre le parasite et sa cellulle hôte. A travers cette membrane doivent s'effectuer des échanges assurant le développement et la multiplication du parasite. L'incorporation d'une protéine comme Gra 3 dans la membrane de la vacuole parasitophore pourrait être une stratégie adoptée par le parasite pour assurer les échanges avec sa cellule hôte. Gra 3, et peut-être d'autres protéines parasitaires, peuvent constituer des canaux ou des transporteurs spécifiques. La topologie de cette protéine reste à définir (ancrée, transmembranaire,...) et renseignerait sur son rôle.

Par comparaison entre les différentes espèces d'Apicomplexa, nous pouvons noter la similitude des processus de l'exocytose des granules denses. Mais la comparaison du devenir et de la fonction de leur contenu après cette exocytose est moins évidente à établir. Il n'existe pas de structure analogue au réseau tubulo-membranaire qui se développe dans la vacuole parasitophore de *Toxoplasma gondii* chez les autres Sporozoaires. Le matériel déchargé des granules denses chez *Sarcocystis muris* persiste dans la vacuole (Entzeroth et al, 1986), à moins que des composants de ce matériel ne soient intégrés dans la membrane de la seconde vacuole parasitophore, ce qui expliquerait l'augmentation des particules au niveau de cette

membrane, observée en cryofracture après le stade d'exocytose des granules denses (Entzeroth et Chobotar, 1989). Chez *Plasmodium falciparum*, il n'y a pas d'inventaire de tout le contenu de ces organites, mais nous disposons de quelques données seulement concernant le RESA: déchargé des granules denses, elle s'intègre dans les structures membranaires de la cellule hôte (Brown *et al.*, 1985; Aikawa *et al.*, 1990; Culvenor *et al.*, 1991). Chez *Plasmodium knowlesi*, après l'invasion (Bannister, 1975; Torii *et al.*, 1989b) le matériel exocyté des granules denses provoquerait l'invagination de la membrane de la vacuole parasitophore et l'agrandissement de l'espace vacuolaire, mais son devenir après cette phase n'est pas rapporté. Le contenu des granules denses de *Theileria parva* (Shaw *et al.*, 1991) est déchargé dans la vacuole parasitophore mais dans ce cas, c'est la vacuole même qui disparaît ensuite et le parasite se retrouve directement dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Quel qu'en soit le mécanisme précis, il semble que le rôle principal du contenu des granules denses est de modifier la cellule hôte au profit du métabolisme parasitaire.

VI-COMMUNAUTE ANTIGENIQUE ENTRE LES STADES TACHYZOITE ET BRADYZOITE

Dans les rapports sur les communautés et les différences antigéniques entre les différents stades du cycle de *Toxoplasma gondii*, l'intérêt a été surtout focalisé sur les protéines de surface (Lunde et Jacobs, 1983; Kasper *et al.*, 1984; Kasper et Ware, 1985; Kasper, 1989; Darcy *et al.*, 1990; Tomavo *et al.*, 1991). Des protéines de rhoptries ont également été rapportées comme communes entre les trois stades sporozoïte, bradyzoïte et tachyzoïte (Sadak *et al.*, 1988). Au niveau des granules denses, Gra 1 et Gra 2 ont été déjà décrites comme étant communes entre les bradyzoïtes et les tachyzoïtes (Cesbron-Delauw *et al.*, 1989; Darcy *et al.*, 1989).

BU LILLE

Nos résultats montrent que les molécules Gra 3 et Gra 4 sont présentes elles aussi dans les granules denses des deux stades tachyzoïte et bradyzoïte. Et en même temps que nous rapportons ici la première caractérisation du contenu des micronèmes, nous montrons que les molécules Mic 1, 2 et 3 sont communes aux deux stades.

La mise en évidence de protéines communes aux différents stades indique qu'elles ne peuvent servir de marqueurs de stade comme la P30 membranaire qui est spécifique du stade tachyzoïte. Mais en revanche, cette communauté suggère une identité de fonction des organites qui les contiennent ou plus précisément de ces protéines. Ces dernières sont sans doute des effecteurs indispensables dans l'interaction des zoïtes de chaque stade avec les cellules hôtes, en particulier lors de l'invasion et de l'installation dans la vacuole parasitophore.

CONCLUSION

Les différences dans les pathologies provoquées par les différentes espèces d'Apicomplexa n'empêchent pas leur rapprochement sur le plan structural et dans leurs modalités d'interaction avec les cellules hôtes. Au niveau structural, de nouvelles évidences sont apportées sur les similitudes des fonctions des organites et des propriétés de leurs constituants lors des différentes étapes de l'interaction Apicomplexa–cellule hôte.

L'implication des micronèmes par exemple dans les processus de la reconnaissance et de l'attachement des zoïtes des Apicomplexa à leurs cellules hôtes est de plus en plus fortement suggérée. Les premières indications sont venues de la constatation de leur raréfaction ou complète disparition chez certaines espèces après l'invasion, puis de la révélation de certains de leur constituants dans des compartiments des cellules hôtes, et dernièrement les séquençages des gènes et protéines correspondantes révèlent l'existence de domaines qui pourraient justifier les propriétés observées pour ces constituants.

Pour les granules denses, la caractéristique commune la moins contestable est l'exocytose de ces organites qui débute avec la fin de l'invasion. Les facteurs qui régissent le déclenchement du phénomène sont encore indéterminés mais les homologies de fonction de ces organites envers l'environnement où doivent se développer ces organismes sont évidents.

Les protéines que nous avons identifiées dans les micronèmes de *Toxoplasma gondii* révèlent d'une part la spécificité des ces organites et leur distinction des autres organites du complexe apical. D'autres part, les propriétés que montrent ces protéines vont dans le sens de l'implication des micronèmes dans les premières étapes de l'interaction de *Toxoplasma gondii* avec la cellule hôte.

Mic 1 possède une affinité pour les membranes des cellules utilisées pour l'entretien des tachyzoïtes. Cette protéine pourrait agir à des doses très faibles ce qui expliquerait le fait que nous n'avons pas pu la localiser sur les cellules hôtes lors des interactions. Cette affinité

membranaire rappelle celle de l'EBA175 de *Plasmodium falciparum* (Camus et Hadley, 1985) qui à été localisée dans les organites du complexe apical et qui pourrait également être une protéine des micronèmes (Sim *et al.*, 1990). La protéine Mic 2 montre une maturation et des transformations strictement liées à l'invasion des tachyzoïtes. Ces modifications rappellent celles observées chez d'autres molécules des micronèmes étudiées dans d'autres modèles comme les récepteurs des protéines des antigènes Duffy chez *Plasmodium knowlesi* (Adams *et al.*, 1990). Ces observations constituent des arguments pour l'hypothèse de l'implication des micronèmes dans les premières étapes de l'invasion.

Le séquençage des gènes codant pour ces protéines doit nous permettre de définir avec plus de précision leurs propriétés. Nous pouvons supposer que des anticorps, dirigés contre ces protéines de micronèmes que nous avons identifiées, pourraient engendrer des effets inhibiteurs sur l'invasion des zoïtes de *Toxoplasma gondii*. L'étude des effets des anticorps dirigés contre le contenu des micronèmes sur l'invasion est envisagée, ce qui pourrait permettre d'affiner le repérage des sites d'actions de ces molécules. Nous envisageons également d'étudier les possibilités de la fixation de Mic 1 sur les tachyzoïtes. Nous pensons que Mic 1 se fixe sur les cellules hôtes pour permettre de faciliter l'invasion des tachyzoïtes. L'existence de la protéine recombinante 421, contre laquelle nous avons produit les sérums des souris et du lapin anti Mic 1, doit également nous permettre d'étudier les possibilités d'augmentation de l'invasion des tachyzoïtes.

En ce qui concerne les granules denses, nous avons suggéré que l'exocytose de ces organites pourrait entraîner l'agrandissement de l'espace de la vacuole parasitophore, soit par action mécanique du matériel déchargé, soit après l'intégration des vésicules ou tubules dans la membrane de la vacuole parasitophore comme nous l'avons observé sur les images des différents stades de l'invasion.

Nous avons suivi la formation du réseau tubulo–membranaire qui se développe dans la vacuole parasitophore, mais les processus de sa structuration et l'inventaire de sa composition restent à préciser. Nous avons montré que le matériel qui se trouve dans la vacuole parasitophore immédiatement après l'invasion des tachyzoïtes provient des granules denses. Nous avons également mis en évidence l'intégration des protéines de ces organites dans les structures tubulo–membranaires développées dans cette vacuole. Toutefois, il manque encore des précisions sur certaines étapes et des explications sur les formations observées, notamment les poches formées vers la partie postérieure des tachyzoïtes, où sont observées les premières structures membranaires de la vacuole parasitophore.

Nous avons par ailleurs mis en évidence un distribution différentielle des protéines des ces organites après exocytose. Gra 3 est la seule protéine parmi celles que nous avons étudiées qui s'associe à la membrane de la vacuole parasitophore. Cette protéine peut servir de marqueur de la vacuole parasitophore et être utilisée dans les études qui viseront à déterminer les relations entre ce compartiment particulier et le reste la cellule hôte. D'autre part, la détermination de sa séquence et sa topologie pourraient permettre de comprendre sa localisation et peut–être déterminer sa fonction.

Certains auteurs portent une attention particulière aux protéines communes entre les différents stades (Darcy *et al.*, 1989) et attribuent à l'existence simultanée de Gra 1 et Gra 2 chez les bradyzoïtes et les tachyzoïtes, un intérêt sur le plan imunoprophylactique dans la toxoplasmose. Le maintien de l'immunité contre la toxoplasmose proviendrait, d'après eux, probablement des stimulations produites par la libération dans la circulation de telles molécules libérées à partir des bradyzoïtes enkystés.

Le fait que Mic 1 et Gra 4 (protéines existant au deux stades bradyzoïte et tachyzoïte) aient été isolées lors du criblage de la banque génomique de *Toxoplasma gondii* par le sérum

d'un lapin immun, suggère leur antigénicité dans les conditions d'infection naturelle. D'autre part, ces protéines ont été identifiée d'après l'expression d'une partie de la protéine codée par la séquence du gène correspondant fusionné à celui de la ßgalactosidase, dans un plasmide et chez une bactérie. La séquence peptidique contient donc le site antigénique, puisque celui–ci est exprimé chez *Escherischia coli* qui ne réalise pas les trasnformations post–traductionnelles des cellules eucaryotes. Comme un épitope séquentiel est plus facile à reproduire qu'un épitope de type conformationnel ou de nature glycosidique, ces molécules peuvent être d'un grand intérêt si ces peptides doivent être utilisés dans le diagnostic sérologique ou dans la protection immune.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, J.H., Hudson, D.E., Torii, M., Ward, G.E., Wellems, T.E., Aikawa, M., Miller, L.H. (1990) The duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoïtes. Cell. **63**:141–153.

Adams, J.H., Bushell, G.R. (1988) The effect of protease inhibitors on *Eimeria vermiformis* invasion of cultured cells. In. J. Parasitol. **18**: 683–685.

Aikawa, M., Sterling, C.R. (1974) Intracellular parasitic Protozoa. Academic Press, New York.

Aikawa, M., Komata, Y., Asai, T., Midorikawa, O. (1977) Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. Am. J. Pathol., **87**, 285–296.

Aikawa, M., Miller, L.H., Rabbege, J., Epstein, N. (1981) Freeze–fracture study of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. J. Cell Biol. **92**: 55–62.

Aikawa, M., Torii, M., Sjolander, A., Berzins, K., Perlmann, P., Miller, L.H. (1990) Pf155/Resa antigen is localized in dense granules of *Plasmodium falciparum* merozoïtes. Exp. Parasitol. **71**: 326–329.

Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J., Rabbege, J. (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J. Cell Biol. **77**: 72–82.

Araujo, F.G. (1991). Depletion of L3T4$^+$ (CD4$^+$) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. Infect. Immun. **59**: 1614–1619.

Bannister, L.H. (1977) The invasion of red cells by *Plasmodium*. Symposia of the British Society for Parasitology, A.E.R. Taylor & R. Muller (Eds), Blackwell, Oxford. **15**: 27–55.

Bannister, L.H., Mitchell, G.H. (1989) The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoïtes during red cell invasion. J. Protozool. **36**: 362–327.

Bannister, L.H., Dluzewski, A.R. (1990) The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections – A Review. Blood Cells **16**:187–192.

Bannister, L.H., Butcher, G.A., Mitchell, G.H. (1977) Recent advances in understanding the invasion of erythrocytes by merozoïtes of *Plasmodium knowlesi*. Bull. WHO, **55**, 163–169.

Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Butcher, G.A., Dennis, E.D. (1986) Lammelar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoïtes of *Plasmodium knowlesi*: a clue to the mechanism of invasion. Parasitology. **92**, 291–303.

Bannister, L.H., Butcher, G.A., Dennis, E.D., Mitchell, G.H. (1975) Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoïtes *in vitro*. Parasitology. **71**, 483–491.

Barnwell, J.W., Wertheimer, S.P. (1989) *Plasmodium vivax*: merozoïte antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. Prog. Clin. Biol. Res. **313**: 1–11.

Barnwell, J.W., Asch, A.S., Nachman, R.L., Yamaya, M., Aikawa, M., Ingravallo, P. (1989) A human 88–kD membrane glycoprotein (CD36) functions *in vitro* as a receptor for

a cytoadherence ligand on *Plasmodium falciparum*–infected erythrocytes. J. Clin. Invest. **84**: 765–672.

Barnwell, J.W., Nichols, M.E., Rubinstein, P. (1989) *In vitro* evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. J. Exp. Med. **169**: 1795–802.

Bonnin, A., Dubremetz, J.F., Camerlynck, P. (1991) Characterization of microneme antigens of Cryptosporidium parvum (Protozoa, Apicomplexa). Infect. Immun. **59**: 1703–1708.

Brown, G.V., Culvenor, J.G., Crewther, P.E., Bianco, A.E., Coppel, R.L., Saint, R.B., Stahl, H.D., Kemp, D.J., Anders, R.F. (1985) Localization of the ring–infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium falciparum* in merozoïtes and ring–infected erythrocytes. J. Exp. Med. **162**: 774–779.

Camus, D., Hadley, T.J. (1985) A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoïtes. Science **230**: 553–556.

Carvalho, L., de Souza, W. (1989) Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoïtes of *Toxoplasma gondii* by macrophages. J. Protozool. **36**: 164–170.

Carvalho, L., Souto–Padron, T., Souza, W. (1991) Localisation of lectin–binding sites and suggar–binding proteins in tachyzoïtes of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. **77**: 156–161.

Cesbron–Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen, G., Cesbron, J.Y., Charif, H., Lepage P., Darcy, F., Lecocq, J.P., Capron, A. (1989) Molecular characterization of a 23–kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). **86**: 7537–7541.

Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron–Delauw, M.F., Capron, A. (1990) *Toxoplasma gondii* – Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoïtes. Exp. Parasitol. **71**: 114–124.

Cochrane, A.H., Aikawa, M., Jeng, M., Nussenzweig, R.S. (1976) Antibody–induced ultrastructural changes of malaria sporozoïtes. J. Immunol. **116**: 859–867.

Cochrane, A.H., Uni, S., Maracic, M., Di, Giovanni, L., Aikawa, M., Nussenzweig, R.S. (1989) A circumsporozoïte–like protein is present in micronemes of mature blood stages of malaria parasites. Exp. Parasitol. **69**: 351–356.

Coppel, R.L., Cowman, A.F., Anders, R.F., Bianco, A.E., Saint, R.B., Lingelbach, K.R., Kemp, D.J., Brown, G.V. (1984) Immune sera recognize on erythrocytes *Plasmodium falciparum* antigen composed of repeated amino acid sequences. Nature. **310**: 789–792.

Coppel, R.L., Brown, G.V., Mitchell, G.F., Anders, R.F., Kemp, D.J. (1984) Identification of a cDNA clone encoding a mature blood stage antigen of *Plasmodium falciparum* by immunization of mice with bacterial lysates. EMBO J. **3**: 403–407.

Couvreur, G., Sadak, A., Fortier, B., Dubremetz, J.F. (1988) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitology. **97**: 1–10.

Couzineau, P., Beaufine-Ducrocq, H. (1969) Etude des possibilités du sarcome TG180 de la souris. Application à la toxoplasmose. Ann. Parasitol. Hum. Comp. **44**: 217-222.

Culvenor, J.G., Day, K.P., Anders, R.F. (1991) *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoïte dense granules after erythrocyte invasion. Infect. Immun. **59**:1183-1187.

Dannemann, B.R., Morris, V. A., Araujo, F.G., Remington J.S. (1989). Assessment of human natural killer and lymphokine-activatzd killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoïtes and brain cysts. J. Immunol. **143**: 2648-2691.

Darcy, F., Charif, H., Caron, H., Deslee, D., Pierce, R.J., Cesbron-Delauw, M.F., Decoster, A., Capron, A. (1990) Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoïtes and bradyzoïtes of *Toxoplasma gondii* with cross-Reactive epitopes. Parasitol. Res. **76**: 473-478.

Darcy, F., Torpier, G., Cesbrondelauw, M.F., Decoster, A., Ridel, P.R., Duquesne, V., Charif, H., Godard, I., Pierce, R.J., Auriault, C., Capron, A. (1989) *Toxoplasma gondii* - New strategies for the identification of antigens of interest in diagnosis and as potential vaccines. Ann. Biol. Clin. **47**: 451-457.

Darcy, F., Deslee, D., Santoro, F., Charif, H., Auriault, C., Decoster, A., Duquesne, V., Capron, A. (1988) Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoïtes of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunology **10**: 553-5567.

Dardé, M.L., Bouteille, B., Leboutet, M.J., Loubet, A., Pestre-Alexandre, M. (1989) *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture. Ann. Parasitol. Hum. Comp. **64**: 403-411.

De Souza, W. (1974) Fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **16**: 32-38.

Deas, J.E., Lee L.T. (1981) Competitive inhibition by soluble erythrocyte glycoproteins of penetration by *Plasmodium falciparum*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **30**: 1164-1167.

Decoster, A., Darcy, F., Capron, A. (1988) Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. Clin. Exp. Immunol. **73**: 376-382.

Dennis, E.D., Mitchell, GH., Butcher, G.A. , Cohen, S. (1975) *In vitro* isolation of *Plasmodium knowlesi* merozoïtes using polycarbonate sieves. Parasitology. **71**: 475-481.

Derouin, J., Rabian-Harzog, C., Sulahian, A. (1989) Longitudinal study of the specific humural and cellular response to *Toxplasma gondii* in a patient with aquired toxoplasmosis. J. Clin. Lab. Immunol. **30**: 87-102.

Derouin, F., Sulcebe, G., Ballet, J.J. (1987) Sequential determination of IgG subclasses and IgA specific antibodies in primary and reactivating toxoplasmosis. Biomed. Pharmaco. **41**: 429-433.

Dluzewski, A.R., Fryer, P.R., griffiths, S., Wilson, J.M., Gratzer, W.B. (1989) Red cell membrane protein distribution during malarial invasion. J. Cell. Sci. **92**: 691–699.

Dubremetz, J.F., Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B. (1987) Characterization of a 42 kDa rhoptry antigen of *Toxoplasma gondii* in: Chang, K.–P., Snary, D. (Eds) Host–Parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, NATO ASI Series H: Cell Biology. **11**: 365–369.

Dubremetz, J.F., Porchet, E. (1978) *Sarcocystis tenella*: Penetration des endozoïtes dans la cellule hote *in vitro*. J. Protozool. 25, Suppl. Abstr. 52A.

Dubremetz, J.F., Rodriguez, C., Ferreira, E. (1985) *Toxoplasma gondii*: redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoïtes during host cell invasion. Exp. Parasitol. **59**: 24–32.

Dubremetz, J.F., Torpier, G. (1978) Freeze fracture study of the pellicle of an Eimerian sporozoïte (Protozoa, Coccidia). J. Ultrastruct. Res. **62**: 94–110.

Dubremetz, J.F., Ferreira, E. (1978) Capping of cationized ferritin by coccidian zoïtes. J. Protozool. **25**: 9B.

Dubremetz, J.F., Torpier, G., Maurois, G., Prensier, G., Sinden, R. (1979) Structure de la pellicule du sporozoïte de *Plasmodium yoelii*: étude par cryofracture. C.R.Acad.Sc.Paris, 288, Serie D, 623–626.

Dubremetz, J.F., Ferreira, E., Dissous, C. (1989) Isolation and partial characterization of rhoptries and micronemes from *Eimeria nieschulzi* zoïtes (Sporozoa, Coccidia). Parasitol. Res. **75**: 449–54.

Dubremetz, J.F. (1981) Le zoïte des coccidies: cytologie, biochimie, physiologie et interactions avec la cellule hôte. Thèse de Doctorat N° 515. Université de Lille I.

Dubremetz, J.F., Dissous, C. (1980) Characteristic proteins of micronemes and dense granules from *Sarcocystis tenella* zoïtes (Protozoa, Coccidia). Mol. Biochem. Parasitol. **1**: 279–289.

Dvorak, J.A., Miller L.H., Whitehouse W.C., Shiroishi T. (1975) Invasion of erythrocytes by malaria merozoïtes. Science **187**: 748–750.

Dzbenski, T.H., Michalak, T., Plonka, WS. (1976) Electron microscopic and radioisotopic studies on cap formation in *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. **14**: 1196–1201.

Dzbenski, T.H., Zielinska, E. (1976) Antibody–induced formation of caps in *Toxoplasma gondii*. Experientia **32**: 454–455.

Endo, T., Yagita, K. (1990). Effect of extracellular ions on motility and cell entry in *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. **37**: 133–138.

Endo, T., Yagita, K., Yasuda T., Nakamura, T. (1988) Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. **75**: 102–106.

Entzeroth, R. Chobotar, B. (1989) A freeze-fracture stady of the host cell-parasit interface during and after invasion of cultured cells by cystozoïtes of *Sarcocystis muris*. Eur. J. Protistology. **27**: 89-99.

Entzeroth, R., König, A., Dubremetz, J.F. (1991) Monoclonal antibodies identify micronemes and a new population of cytoplasmic granules cross-reacting with micronemes of cystozoites of *Sarcocystis muris*. Parasitol. Res. **77**: 59-64.

Entzeroth, R., Dubremetz, J.F., Hodick, D., Ferreira, E. (1986) Immunoelectronmicroscopic demonstration of the exocytosis of dense granules contents into the secondary parasitophorous vacuole of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa). Eur. J. Cell Biol. **41**: 182-188.

Entzeroth, R. (1984) Electron microscope study of host-parasite interactions of *Sarcocystis muris* (Protozoa, coccidia) in tissue culture and *in vivo*. Z. Parasitenkd. **70**: 131-134.

Entzeroth, R. (1985) Invasion and early development of *Sarcocytis muris* (Apicomplexa, Sarcocystidae) in tissue cultures. J. Protozool. **32**: 446-453.

Erbe, D., Pfefferkorn, E.R., Fanger, M.W. (1991). Functions of the various human IgG Fc receptors in mediating killing of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. **146**: 3145-3151.

Facer, C.A. (1984) Antibodies to red cell glycophorin inhibit invasion by *Plasmodium falciparum* merozoïtes. Med. Sci. **12**: 314-315.

Facer, C.A. (1983) Erythrocyte sialoglycoproteins and *Plasmodium falciparum* invasion. Tras. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **77**: 524-530.

Ferguson, D.J.P., Hutchison, W.M. (1987) An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol. Res. **73**: 483-491.

Fine, E., Aikawa, M., Cochrane, A.H., Nussenzweig, R.S. (1984) Immuno-electron microscopic observations on *Plasmodium knowlesi* sporozoïtes: localization of protective antigen and its precursors. Am. J. Trop. Med. Hyg. **33**: 220-226.

Foussard, F., Leriche, M.A., Dubremetz, J.F. (1991) Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. Parasitology. **102**: 367-370.

Frenkel, J.K., Dubey, J.P., Miller, N.L. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. Science, **167**: 893-896.

Frenkel, J.K. (1988) Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitol. Today, **4**: 273-278.

Fuhrman, S.A., Furtado, G.C., Kleinman, H., Joiner, K.A. (1989) Surface-exposed membrane proteins of *Toxoplasma gondii* and their interaction with laminin. UCLA meeting, Keyrstone, Co. Abstract n° 422.

Fuller, A.L., Mcdougald, L.R. (1990) Reduction in cell entry of *Eimeria tenella* (Coccidia) sporozoïtes by protease inhibitors, and partial characterization of proteolytic activity associated with intact sporozoïtes and merozoïtes. J. Parasitol. **76**: 464-467.

Garnham, P.C.C., Bird, R.G., Baker, J.R. (1960) Electron microscope study of motile stages of malarial parasites. 1. The fine structure of the sporozoïtes of Haemamoeba (=*Plasmodium*) gallinacea. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **54**: 274–278.

Godard, I., Darcy, F., Deslee, D., Dessaint, J.P., Capron, A. 1990 Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice – Kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin–A antibodies. Infect. Immun. **58**: 2446–2451.

Grimwood, B.G., Hechemy, K., Stevens, R.W. (1979) *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoïtes propagated in cell culture. Exp. Parasitol. **48**: 282–286.

Gustafson, P.V., Agar, H.D., Cramer, D.J. (1954) An electron microscope study of*Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **3**: 1008–1021.

Hamilton, A.J., Suhrbier, A., Nicholas, J., Sinden, R.E. (1988) Immunoelectron microscopic localization of circumsporozoïte antigen in the differentiating exoerythrocytic trophozoïte of *Plasmodium berghei*. Cell. Biol. Int. Rep. **12**: 123–129.

Handman, E., Goding, J.W., Remington, J.S. (1980) Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. **124**: 2578–2583.

Haynes, J.D., Dalton, J.P., Klotz, F.W., McGinnis, M.H., Hadley, T.J., Hudson, D.E., Miller, L.H. (1988) Receptor– like specificity of *Plasmodium knowlesi* malarial protein bind to Duffy antigen ligands on erythrocytes. J. Exp. Med. **167**: 1873–1881.

Heller, G., Scholtysecck, E. (1971) Feinstuktuuntersuchungen zur merozpïten bildung bei *Eimeria stiedae* (sporozoa, coccidia). Protistology. **7**: 451–460.

Holt, E.H., Nichols, M.E., Etzion, Z., Perkins, M.E. (1989) Erytrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* isolates differing in sialic acid dependency in the presence of glycoproteine A antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **40**: 245–251.

Hughes, H.P.A., Connelly, C.A., Strangeways, J.E.M., Hudson, L. (1984) Antigen specific lymphocyte transformation induced by secreted antigens from *Toxoplasma gondii*. Clin. Exp. Immunol. **58**: 539–547.

Hughes, H.P., Boik, R.J., Gerhardt, S.A., Speer, C.A. (1989) Susceptibility of *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates and a new mathematical model for parasite killing. J. Parasitol. **75**: 489–497.

Hughes, H.P., Kasper, L.H., Little, J., Dubey, J.P. (1988) Absence of a role for natural killer cells in the control of acute infection by *Toxoplasma gondii* oocysts. Clin. Exp. Immunol. **72**: 394–399.

Hutchison, W. M. (1965) Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature (London) **206**: 961–962.

Hutchison, W.M., Dunachie, J.F., Siim J. C., Work, K. (1970) Coccidian–like nature of *Toxoplasma gondii*. Brit. Med. J. **1**: 142–144.

Iams, K.P., Young, J.R., Nene, V., Desai, J., Webster, P., Olemoiyoi, O.K., Musoke, A.J. (1990) Characterisation of the gene encoding a 104-kilodalton microneme-rhoptry protein of *Theileria parva*. Mol. Biochem. Parasitol. **39**: 47-60.

Jacobs, L. (1967) *Toxoplasma* and toxoplasmosis. Adv. Parasitol. **5**: 1-45.

Jensen, J.B., Edgar, S.A. (1976) Possible secretory function of the rhoptries of *Eimeria magna* sporozoïtes during penetration of cultured cells. J. Parasitol. **61**: 988-992.

Johnson, J.G., Epstein, N., Shiroishi, T.,MIller, L.H. (1980) Factors affecting the ability of the *Plasmodium knowlesi* merozoites to attachement and invade erythrocytes. Parasitology. **80**: 539-542.

Johnson, A.M., McDonald, P.J., Neoh, S.H. (1983) Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from Toxoplasmosis. J. Protozool. **30**: 351-356.

Joiner, K.A., Glaucia, F. Mellman, I., Kleinman H., Miettinen, H., Kasper L.H., Lee, H. and Fuhrman, S.A. (1989) Cell attachement and invasion by tachyzoïtes of *Toxoplasma gondii*. UCLA meeting Keystone, Co. Abstract n° 2.

Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H.M., Kasper, L.H., Mellman, I. (1990) *Toxoplasma gondii* - fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc-receptor transfected fibroblasts. Science, **249**: 641-646.

Jones, T.C., Hirsch, J.G. (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II: The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles contening living parasites. J. Exp. Med. **136**: 1173-1194.

Jones, T.C., Yeh, S., Hirsch, J.G. (1972) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I: Mecanisme of entry and intracellular fate of parasite. J. Exp. Med. **136**: 1157-1172.

Jungery, M., Pasvol, G., Newbold, C.I., Weatherall, D.J. (1983) A lectin-like receptor is involved in invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). **80**: 1018-1022.

Kasper, L.H. (1989) Identification of stage specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. **57**: 668-672.

Kasper, L.H., Bradley, M.S., Pfefferkorn, E.R. (1984) Identification of stage-specific sporozoïte antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. J. Immunol. **132**: 443-449.

Kasper, L.H., Crabb, J.H., Pfefferkorn, E.R. (1982) Isolation and characterization of a monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. **129**: 1694-1699.

Kasper, L.H., Ware, P.L. (1985) Recognition and characterization of stage-specific oocyt/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. J. Clin. Invest. **75**: 1570-1577.

Kasper, LH. (1987) Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. **9**: 433-445.

Kasper, L.H., Currie, K.M., Bradley, M.S. (1985) An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoïte antigen (P 30) of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. **134**: 3426-3431.

Khöler, G., Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London) **256**: 495-497.

Kimata, I., Tanabe, K. (1987) Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. J. Cell. Sci. **88**: 231-239.

King, C. A. (1988) Cell motility of Sporozoan protozoa. Parasitology Today. **4**: 315-319.

Klotz, F.W., Chulay, J.D., Daniel, W., Miller, L.H. (1987) Invasion of mouse erythrocytes by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J. Exp. Med. **165**: 1713-1718.

Krug, E.C., Marr, J.J., Berens, R.L. (1989) Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. **264**: 10601-10607.

Ladda, R.L. Aikawa, M., Sprinz, H. (1969) Penetration of erythrocytes by merozoïtes of mammalian and avian malarial parasites. J. Parasitol. **65**: 633-644.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.

Laugier, M., Quilici, M. (1970) Intérêt expérimental d'une souche de Toxoplasme peu pathogène pour la souris. Ann. Parasitol. Hum. comp. **45**: 389-403.

Lee, C., Levin, A. and Branton, D. (1987). Copper staining: A five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **166**: 308-312.

Leriche, M.A. (1989) Caractérisation du contenu protéique des rhoptries et des granules denses du tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

Leriche, M.A., Dubremetz, J.F. (1991) Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoïtes by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. **45**: 249-260.

Leriche, M.A., Dubremetz, J.F. (1990) Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. Parasitol. Res. **76**: 413-414.

Levine, L.D., Corliss, Cox, F.E.G., J.O, Deroux, G, Gran, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G. (1980). A Newly revised classification of Protozoa. J. Protozool. **27**: 37-58.

Lunde, M.N., Jacobs, L. (1983) Antigenic differences between endozoïtes and cystozoïtes of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. **69**: 806–808.

Lycke, E., Norrby, R. (1966) Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured host cells. Brit. J. Exp. Pathol. **47**: 248–256.

Lycke, E., Calberg, K., Norrby, R. (1975) Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host cell: function of the penetration–enhancing factor of *Toxoplasma*. Infect. Immun. **11**: 853–861.

Matsumoto, Y., Perry, G., Scheibel, L.W., Aikawa, M. (1987) Role of calmodulin in *Plasmodium falciparum*: implications for erythrocyte invasion by the merozoïte. Eur. J. Cell. Biol. **45**: 36–43.

Mauel, J.W. (1983) Effect of exogenous electron carriers on intracellular parasite killing. Molecular Biology of host–parasite interactions, Eds: N. Agabian, H. Eisen, Abstr n°8.

Mehlhorn, H., Frenkel, J.K. (1980) Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammonda hammondi* in skeletal muscle of mice. J. Parasitol. **66**: 59–67.

Mellors, J.W., Debs, R.J., Ryan, J.L. (1989) Incorporation of recombinant gamma interferon into liposomes enhances its ability to induce peritoneal macrophage antitoxoplasma activity. Infect. Immun. **57**: 132–137.

Mevelec, M.N., Chardès, T., Mercereau–Puijalon, O., Bourguin, I., Achbarou, A., Dubremetz, J.F., Bout, D. (1991) Molecular cloning of a gene fragment encoding GRA 4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. (soumis).

Michel, R., Schupp, K., Raether, W., Bierther, F.W., (1980) Formation of a close junction during invasion of erythrocytes by *Toxoplasma gondii in vitro*. Int. J. Parasitol. **10**: 309–313.

Mikkelsen, R.B., Kamber, M., Lin, P.S., Schmidit–Ullrich, R., (1988) The role of lipids in *Plasmodium falciparum* invasion of erytrocytes: A coordinated biochemical and microscopic analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **85**: 5956–5960.

Miller, L.H., Hudson D., Haynes J.D. (1988) Identification of *Plasmodium knowlesi* erythrocyte binding proteins. Mol. Biochem. Parasitol. **31**: 217–222.

Miller, L.H., Aikawa, M., Johnson, J.G., Shiroishi, T. (1979) Interaction between cytochalasin–B treated malaria parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. J. Exp. Med. **149**: 172–184.

Miller, L.H., Mason, S.J., Dvorak, J.A., McGinniss, M.H., Rothman, I.K. (1975) Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. Science. **189**: 561–563.

Miller, L.H., David, P.H., Hadley, T.J., Hudson, D.E. (1983) Malaria merozoïte invasion of erythrocytes. Molecular Biology of host–parasite interactions, Eds. N. Agabian, H. Eisen, Abstr. 0017.

Morrissey, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. **117**: 307–310.

Murray, H.W., Cohn, Z.A. (1979) Macrophage oxygen–dependaent antimicrobial activity I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermidiates. J. Exp. Med. **150**: 938–949.

Murray, H.W. (1983) Macrophage oxygen–dependent killing of intracellular parasites: *Toxoplasma* and *Leishmania*. Adv. Exp. Med. Biol. 162, 127–143

Nichols, B.S., Chiappino, M.L., O'Connor, G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during hosy–cell invasion. J. Ultrastruct. Res. **83**: 86–98.

Nichols, B.A., Chiappino, M.L. (1987) Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. **34**: 217–226.

Nicolle, C., Manceaux, L. (1908) Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondii. C. R. Acad. Sci. (Paris) **147**: 763–766.

Norrby, R. (1970) Host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. **2**: 250–255.

O'Farrel, P. (1975) High resolution two–dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol.Chem. **250**: 4007–4021.

Orlandi, P.A., Sim, B.K.L., Chaulay, J.D., Haynes, J.D. (1990) Characterization of 175–kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. **40**: 285–294.

Ossorio, P.N., Schxartzman, J.D, Boothrooyd, J.C. (1991) A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with cell penetration has unusual charge asymmetry. Mol. Bioch. Parasitol. (sous presse)

Parker, S.J., Smith, F.M., Johnson, A.M. (1991) Murine immune responses to *Toxoplasma gondii* antigens. J. Parasitol. **77**: 402–409.

Pasvol, G., Wainscoat, J.S., Weatherall, D.J. (1982) Erythrocytes deficient in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Nature. **297**: 64.

Perkins, M.E. (1984) Binding of glycophorins to *Plasmodium falciparum* merozoïtes. Mol. Biochem. Parasitol. **10**: 67–78.

Perkins, M.E., Rocco, L.J. (1988) Sialic acid–dependent binding of *Plasmodium falciparum* surface antigen, PF200, to human erythrocytes. J. Immunol. **141**: 3190–3196.

Perkins, M. (1981) Inhibitory effects of erythrocyte membrane proteins on the *in vitro* invasion of human malarial parasite (*Plasmodium falciparum*) into host cell. J. Cell Biol. **90**: 563–567.

Perlmann, H., Berzins, K., Wahlgren, M., Carlsson, J., Bjorkman, A., Patarroyo, M.E., Perlmann, P. (1984) Antibodies in malarial sera to parasite antigens in the membrane of erythrocytes infected with early asexual stages of *Plasmodium falciparum*. J. Exp. Med. **159**: 1686–1704.

Pohl, U., Dubremetz, J.F., Entzeroth, R. 1989 Characterization and immunolocalization of the protein contents of micronemes of *Sarcocystis muris* cystozoïtes (Protozoa, Apicomplexa). Parasitol. Res. **75**: 199–205.

Porchet–Hennere, E., Torpier, G. (1983) Relations entre *Toxoplasma* et sa cellule–hôte. Protistologica **19**: 357–370.

Porchet, E., Torpier, G. (1977) Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. Z. Parasitenkd. **54**: 101–124.

Porchet–Hennere, E., Nicolas, G. (1983) Are rhoptries of Coccidia really extrusomes? J. Ultrastr. Res. **84**: 194–203.

Porchet–Hennere, E., Vivier, E. (1971) Ultrastructure comparée des germes infectieux (sporozoïtes, mérozoïtes, schizozoïtes, endozoïtes, etc) chez les sporozoaires. Ann. Biol. **10**: 77–113.

Prince, J.B., Araujo, F.G., Remington, J.S., Burg, J.L., Boothroyd, J.C., Sharma, S.D. (1989) Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. **34**: 3–13.

Roger, N., Dubremetz, J.F., Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G., Vernes, A. (1988) Characterization of a 225 kilodalton rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. **27**: 135–141.

Roger–Leroux, N. (1990) Caractérisation de protéines de haut poids moléculaire présentes dans les rhoptries des zoïtes de deux sporozoaires: *Plasmodium falciparum* et *Toxoplasma gondii*. Thèse de doctorat ès sciences pharmaceutiques, Lille II.

Russell, D.G. (1983) Host cell invasion by Apicomplexa: an expression of the parasite s contractile system. Parasitology. 199–209.

Russell, D.G., Sinden, R.E. (1981) The role of cytoskeleton in the motility of Coccidian sporozoïtes. J. Cell Science. **50**: 345–359.

Ryning, F.W., Remington, J.S. (1978) Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. Infect. Immun. **20**: 739–743.

Sabin, A.B. (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Assoc. **116**: 801–807.

Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B., Dubremetz, J.F. (1988) Characterization of a familly of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. **29**: 203–211.

Sadak, A. (1988) Caracterisation biochimique des compartiments subcellulaires de *Toxoplasma gondii* par les anticorps monoclonaux. Thèse de doctorat d'etat es sciences naturelles. Université Mohammed V, Rabat.

Saffer, L.D., Mercereau-Puijalon, O., Dubremetz, J.F., Schawrtzman, J.D. (1991) Localisation of *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopiy during and after host cell penetration. J. Protozool. (sous presse)

Saffer, L.D., Krug, S.A.L., Schartzman, J.D. (1989) The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. Ann. J. Trop. Med. Hyg. **40**: 145–149.

Saint Blancard, J., Kirzin, J.M., Riberon, P., Petit, F., Fourcart, J., Girot, P., Boschetti, E. (1982) A simple and rapid procedure for large scale preparation of IgGs and albumin from human plasma by ion exchange and affinity chromatography. **In**: Affinity Chromatography and Related Techniques. Elsevier (Ed) Amsterdam. 305–312.

Sam-Yellowe, T.Y., Perkins, M.E. (1990) Binding of *Plasmodium falciparum* rhoptry proteins to mouse erythrocytes and their possible role in invasion. Mol. Biochem. Parasitol. **39**: 91–100.

Sam-Yellowe, T.Y., Shio, H., Perkins, M.E. (1988) Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes. J. Cell. Biol. **106**: 1507–13.

Schulman, S., Lee, Y.C., Vanderberg, J.P. (1984) Effects of neoglycoproteins on penetration of *Plasmodium falciparum* merozoïtes into erythrocytes *in vitro*. J. Parasitol. **70**: 213–216.

Schwartzman, J.D. (1986) Inhibition of a penetration enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. Infect. Immun. **51**: 760–764.

Schwartzman, J.D., Pfefferkorn, E.R. (1983) Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the Coccidian *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. **30**: 657–661.

Schwartzman, J.D., Krug, E.C. (1989) *Toxoplasma gondii*: Characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. Exp. Parasitol. **68**: 74–82.

Senaud, J. (1967) Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes (*Toxoplasma*). Protistologica. **3**: 167–232.

Sethi, K.K., Endo, T., Brandis, H. (1981) *Toxoplasma gondii* trophozoïtes precoated with specific monoclonal antibodies cannot survive within normal murine macrophages. Immunol. Letters. **2**: 343–346.

Sharma, S.D., Mullenax, J., Araujo, F.G., Erlich, H.A., Remington, J.S. (1983) Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. J. Immunol. **131**: 977–982.

Shaw, M.K., Tilney, L.G., and Musoke, A.J. (1991). The entry of *Theileria parva* sporozoïte into bovine lymphocytes: evidence for MHC classe I involvement. J. Cell. Biol. **113**: 87–101.

Sibley, L.D., Krahenbuhl J.L., Adams G.M.W., Weidner E. (1986) *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface Proteins. J. Cell. Biol. **103**: 867–874.

Sibley, D.L., Boothroyd, J.C. (1991) Calcium regulation and modification of host cell endocytotic compartiments by *Toxoplasma*. J. Cell Biol. **115**: 5a, Abstract n° 22.

Sibley, D.L., Lawson, R., Weidner, E. (1986) Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. **19**: 83–87.

Sibley, LD., Krahenbuhl, JL. (1988) Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. Eur. J. Cell Biol. **47**: 81–87.

Sibley, L.D., Sharma, S.D. (1987) Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. Infect. Immun. **55**: 2137–2141.

Sibley, D.L., Krahenbuhl, J.L., Weidner, E. (1985) Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. **49**: 760–764.

Sibley, L.D. (1985) Physiology of macrophage vacuoles containing *Toxoplasma gondii*. VII International Congress of Protozoology, Nairobi, Abstract n°349

Sibley, L. D., Weidner, E., and Krahenbuhl,J. L. (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. Nature. **315**: 416–419.

Sim, B.K.L., Orlandi, P.A., Haynes, J.D., Klotz, F.W., Carter, J.M., Camus, D., Zegans, M.E., Chulay, J.D. (1990) Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoïte invasion. J. Cell. Biol. **111**: 1877–1884.

Sinden, R.E. (1985) A cell biologist's view of host cell recognition and invasion by malarial parasites. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **79**: 598–605.

Slot, J.W., Geuze, H.J. (1985) A new method for preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Eur. J. Cell Biol. **38**: 87–93.

Stewart, M.J., Schulmann, S., Vanderberg, J. (1985) Rhoptry secretion of membranous whorls by *Plasmodium berghei* sporozoïtes. J. Protozool. **32**: 280–283.

Tanabe, K., Kimata, I., Takada, S. (1980) Penetration of chich embryo erythrocytes by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simplified incubation media. J. Parasitol. **66**: 240–244.

Taylor, D.W., Evans, C.B., Aley, S.B., Barta, J.R., Danforth, H.R. (1990). Identification of an apically-located antigen that is conserved in sporozoan parasites. J. Protozool. **37**: 540–545.

Thomas, A.W., Bannister, L.H., Waters, A.P. (1990) Sixty-six kilodalton-related antigens of *Plasmodium knowlesi* are merozoïte surface antigens associated with the apical prominence. Parasite Immunol. **12**: 105-113.

Tomavo, S., Schwarz, R.T., Dubremetz, J.F. (1989b) Evidence for Glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. Mol. Cell. Biol. **9**: 4576-4580.

Tomavo, S., Fortier, B., Soete, M., Ansel, C., Camus, D., Dubremetz, J.F. (1991) Characterization of bradyzoïte-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. **59**: 3750-3753.

Tomavo, S., Dubremetz, J.F., Entzeroth, R. (1989a) Characterization of a surface antigen of *Eimeria nieschulzi* (Apicomplexa, Eimeriidae) sporozoïtes. Parasitol. Res. **75**: 343-347.

Tomley, F.M., Clarrke, L.E., Kawazoe, U., Dijkema, R., Kok, J.J. (1991) Sequence of the gene encoding an immunodominant micronème protein of *Emeria tenelle*. Mol. Biochem. Parasitol. **49**: 277-288.

Torii, M., Adams, J.H., Miller, L.H., Aikawa, M. (1989b) Release of merozoïte dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. Infect. Immun. **57**: 3230-3233.

Torii, M., Matsumoto, Y., Kamboj, K.K., Maracic, M., Guo, S.Q., Nussenzweig, R.S., Aikawa, M., Cochrane, A.H. (1989a) Association of microneme antigens of *Plasmodium brasilianum* merozoïtes with knobs and other parasite-induced structures in host erythrocytes. Infect. Immun. **57**: 596-601.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1978) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). **76**: 4350-4354.

Ullman, A. (1984). One-step purification of hybrid proteins which β-galactosidase activity. Gene, **29**: 27-31.

Uni, S., Masuda, A., Stewart, M.J., Igarashi, I., Nussenzweig, R., Aikawa, M. (1987) Ultrastructural localization of the 150/130 Kd antigens in sexual and asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. Am. J. Trop. Med. Hyg. **36**: 481-488.

Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E., Ross, T.G. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocrinol. Metabol. **33**: 988-991.

Vivier, E., Petitprez, A. (1972) Données Ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques, sur *Toxoplasma gondii*. Protistologica, **8**: 199-221.

Vivier, E., Petitprez, A.J. (1969) Le complexe membranaire et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils de *Toxoplasma gondii*. J. Cell. Biol. **43**: 329-342.

Werk, R., Dunker, R., Fisher, S. (1984) Polycationic polypeptides: A possible model for the penetration enhancing factir in the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. J. Gen. Microbiol. **130**: 927-933.

Werk, R. (1985) How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? Rev.Inf. Dis. **7**: 449–457.

Work, K., Hutchison, W. M. (1969) The new cyst of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. **75**: 414.

Yasuda, T., Yagita, K., Nakamura, T., Endo, T. (1988) Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. **75**: 107–113.

Yong, E. C., Chi, E. Y., Fritsches T.R., Henderson, W.R. (1991) Human platelet–mediated cytotoxicity against *Toxoplasma gondii*: role of thromboxanes. J. Exp. Med. **173**: 65–78.

PLANCHES

PLANCHE I

Immunoempreintes réalisées sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* après SDS-PAGE (gel à 12% d'acrylamide) et transfert sur feuille de nitrocellulose.

Figure A: conditions non réductrices
Figure B: conditions réductrices.

1: AcMc III 3E10
2: AcMc T3 4A11
3: AcMc T4 2F3
4: Sérum de souris anti 421
5: AcMc T4 2F6
6: Sérum de souris anti 205
7: AcMc T6 2H11
8: AcMc T4 1F5
9: AcMc T5 2B4

Figure C: immunoempreinte réalisée avec l'AcMc T4 1F5 (mini gel à 12% d'acrylamide; conditions réductrices).

1: lysat de cellules Véro infestées par des tachyzoites.
2: lysat de tachyzoïtes purifiés sur laine de verre.
3: lysat de cellules Véro non infestées.

Les poids moléculaires (en kilodaltons) des bandes ont été déterminés en fonction de la migration des marqueurs de poids moléculaires (bas poids moléculaires: Pharmacia LMW et haut poids moléculaires: Sigma, SDS-HMW kit).

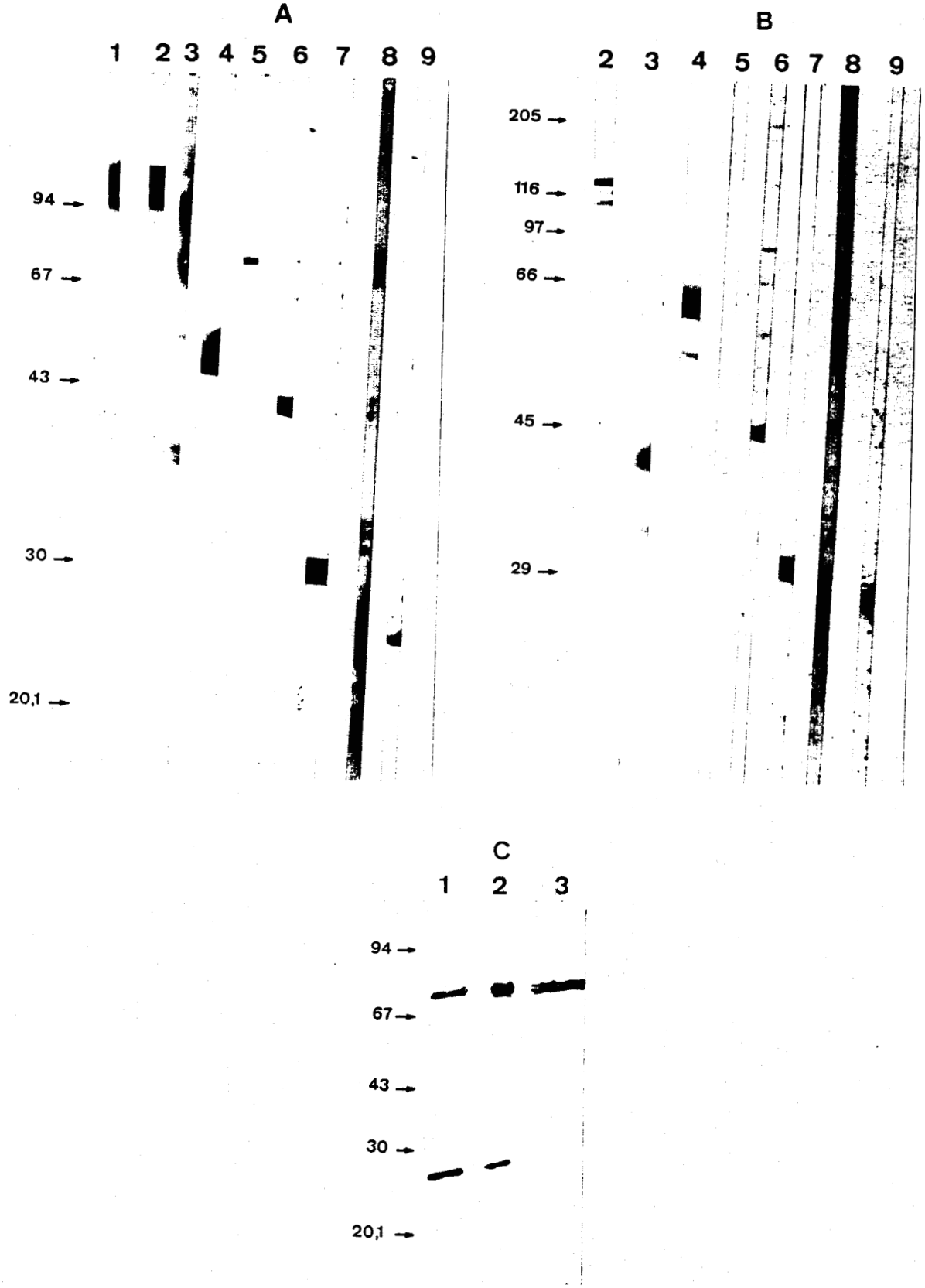

A
1 2 3 4 5 6 7 8 9
94
67
43
30
20,1
B
2 3 4 5 6 7 8 9
205
116
97
66
45
29
C
1 2 3
94
67
43
30
20,1

PLANCHE II

Analyse électrophorétique des fractions solubles et insolubles du lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* et identification des protéines des tachyzoïtes à affinité membranaire.

Figure A: Immunoempreintes réalisées sur la fraction soluble (a) et le culot (b) d'un lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* (par congélations/décongélations et centrifugation à 13 000g pendant 30 min) après SDS-PAGE (gel à 12% d'acrylamide; conditions non réductrices) et transfert sur feuille de nitrocellulose.

1: AcMc T3 4A11
2: AcMc T4 2F3
3: sérum de souris anti 421
4: AcMc T4 2F6
5: sérum de souris anti 205
6: AcMc T6 2H11
7: AcMc T4 1F5
8: AcMc T5 2B4

Figure B: Immunoempreintes réalisées avec:

(a): le sérum du lapin anti tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*
(b): l'AcMc T3 4A11
(c): le sérum de souris anti 421

après SDS-PAGE (mini-gel à 12 % d'acrylamide; conditions non réductrices) et transfert sur nitrocellulose:

1: surnageant du lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*
2: lysat de cellules Véro
3: lysat de cellules Véro qui ont été incubées, pendant une heure à 37°C, en présence du surnageant du lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*.

Figure C: Immunoempreintes réalisées avec:

(a): le sérum du lapin anti tachyzoïtes
(b): le sérum de souris anti 421

après SDS-PAGE (mini gel à 12% d'acrylamide; conditions réductrices) et transfert sur feuille de nitrocellulose:

1: surnageant du lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* ayant séjourné pendant 1 heure à 37°C (= temps d'incubation des cellule Véro en présence du surnagent à 37°C)
2: surnageant du lysat des tachyzoïtes
3: lysat de cellules Véro qui ont été incubées en présence du surnageant du lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*.

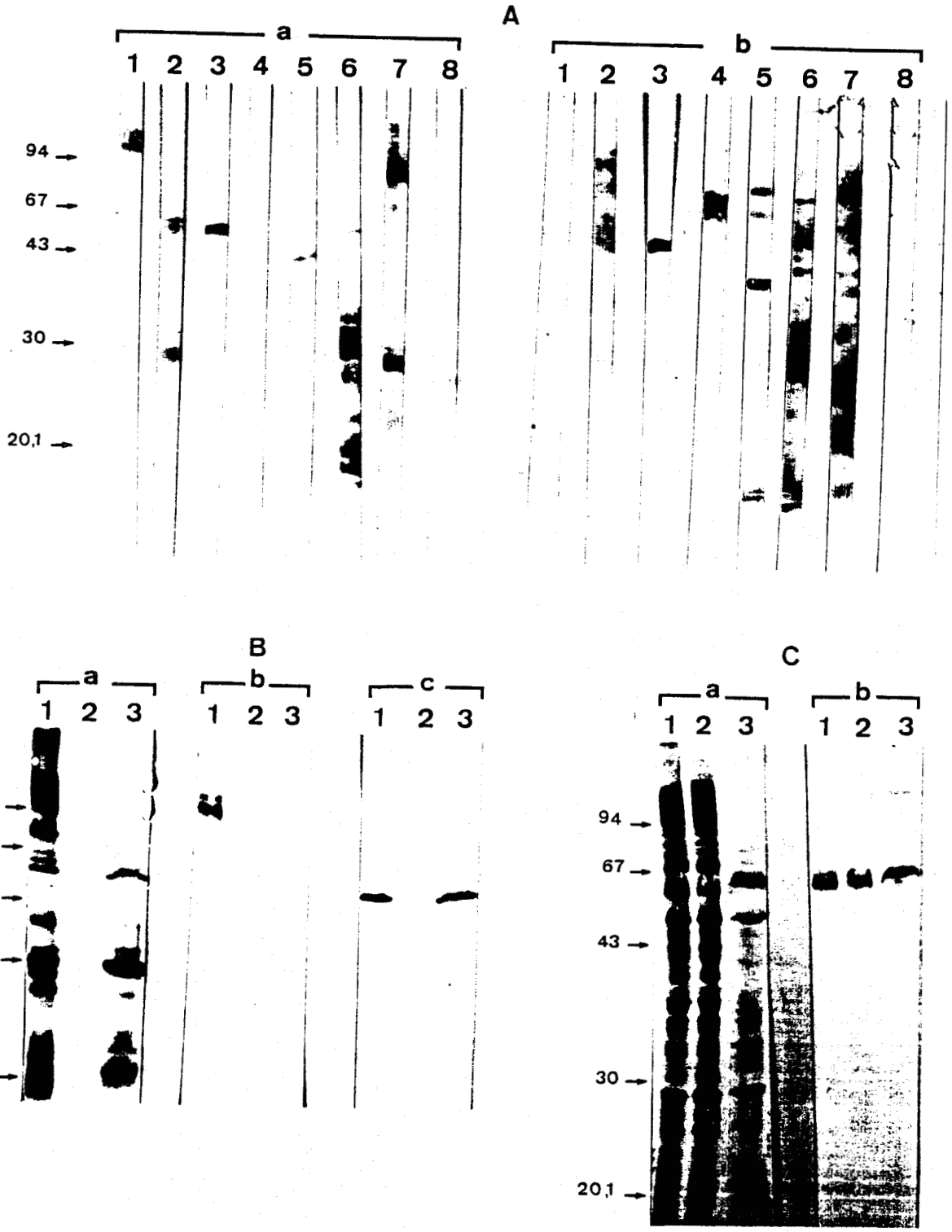

A
a
1 2 3 4 5 6 7 8
b
1 2 3 4 5 6 7 8
94
67
43
30
20,1
B
a
1 2 3
b
1 2 3
c
1 2 3
94
67
43
30
20,1
C
a
1 2 3
b
1 2 3
94
67
43
30
20,1

PLANCHE III

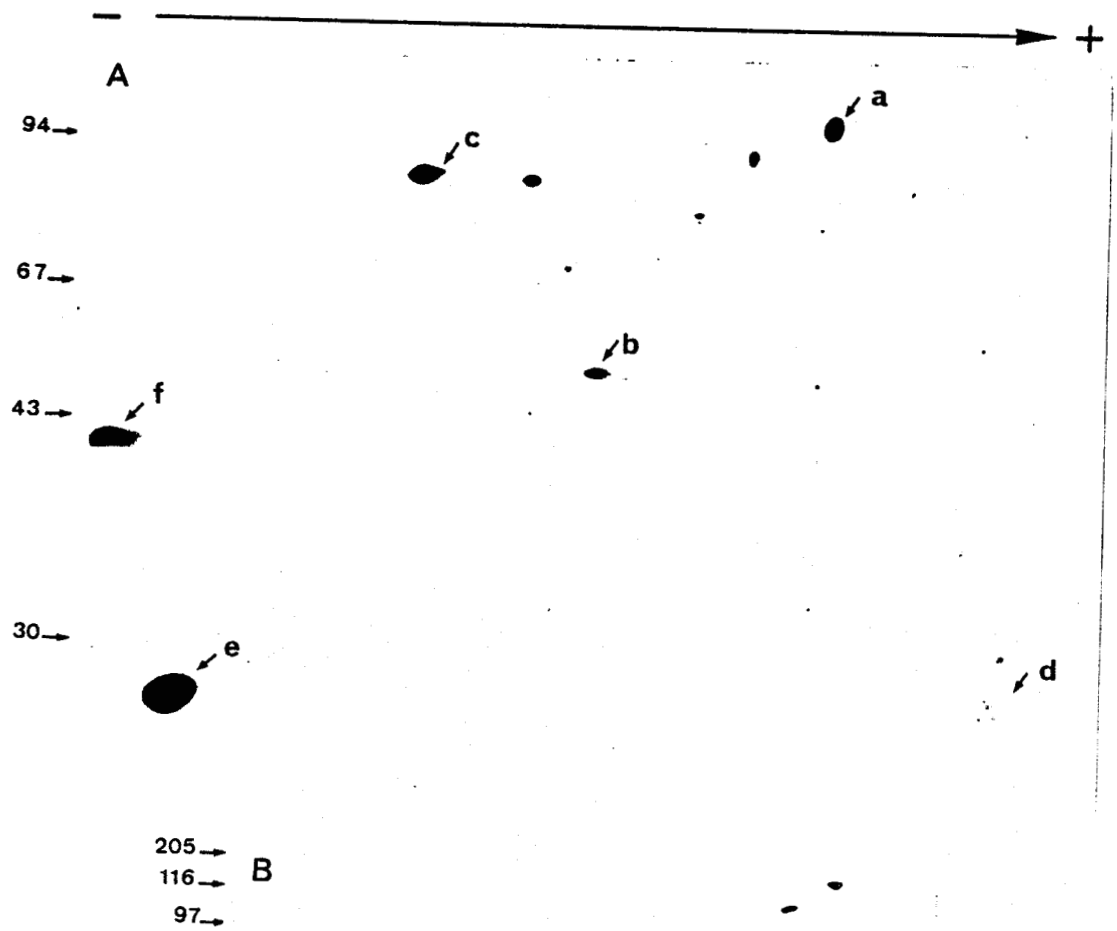
Immunoempreintes réalisées sur lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* après électrophorèse bidimensionnelle et transfert sur feuille de nitrocellulose. Pour l'isofocalisation (1ère dimension), le dépôt des lysats est réalisé du côté de la cathode (-) et la migration (sens de la flèche) s'est faite vers l'anode (+). La deuxième dimension est une SDS-PAGE (gel à 12% d'acrylamide)

Figure A: Immunoempreintes réalisées sur un même lysat, successivement avec différentes sondes (conditions non réductrices)

a: AcMc T3 4A11
b: sérum de souris anti 421
c: AcMc T4 2F3
d: AcMc T5 2B4
e: AcMc T4 1F5
f: sérum de souris anti 205

Figure B: Immunoempreinte réalisée avec l'AcMc T3 4A11 sur lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* réduit par le DTT.

Figure C: Immunoempreinte réalisée avec l'AcMc T4 2F3 sur lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* réduit par le DTT.


−
+
A
94
67
43
30
a
b
c
d
e
f

205
116
97
B

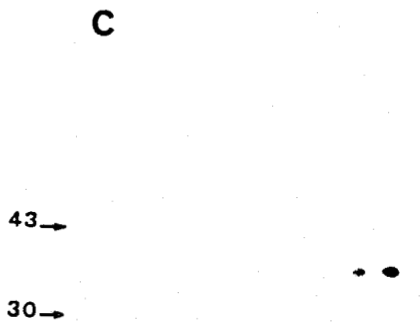

C
43
30

PLANCHE IV

Analyses électrophorétiques des résultats des purifications des protéines de *Toxoplasma gondii* et des immunoempreintes produits par les sérums des lapins immunisés avec ces protéines purifiées.

Figure A: Profil électrophorétique (après coloration du gel au nitrate d'argent) d'un éluat de l'immunoadsorbant préparé avec l'AcMc T4 2F3 après le passage d'un lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*.

Figure B: Immunoempreinte réalisée avec l'AcMc T4 2F3 sur un éluat de l'immunoadsorbant préparé avec le même AcMc.

Figure C: Profil électrophorétique (après coloration du gel au nitrate d'argent) d'un éluat de l'immunoadsorbant préparé avec l'AcMc T6 2H11, après le passage d'un lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* (1);
(2): marqueurs de poids moléculaires (Pharmacia, bas poids moléculaires).

Figure D: Profil électrophorètique (après coloration du gel au bleu de Coomassie) d'un éluat de l'immunoadsorbant préparé avec l'AcMc T6 2H11, après le passage d'un lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* (2);
(1): marqueurs de poids moléculaires (Pharmacia, bas poids moléculaire).

Figure E: Immunoempreintes réalisées sur un éluat de l'immunoadsorbant préparé avec l'AcMc T6 2H11 avec:

1: le sérum du lapin anti souris couplé à la phosphatase alcaline

2: l'AcMc T6 2H11

Figure F: Immunoempreintes réalisées sur un lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, après SDS–PAGE (gel à 12% d'acrylamide; conditions non réductrices) et transfert sur feuille de nitrocellulose.

2: sérum du lapin immunisé par un éluat à partir de l'immunoadsorbant préparé avec l'AcMc T4 2F3 (1: sérum du même lapin avant immunisation)

4: sérum du lapin immunisé par la protéine recombinante 421 (3: sérum du lapin même avant immunisation)

6: sérum du lapin immunisé par la protéine recombinante 205 (5: sérum du même lapin avant immunisation)

8: sérum du lapin immunisé par la protéine de 30 kDa immunoprécipité par l'AcMc T6 2H11 et électroéluée après une électrophorése préparative (7: sérum du même lapin avant immunisation).

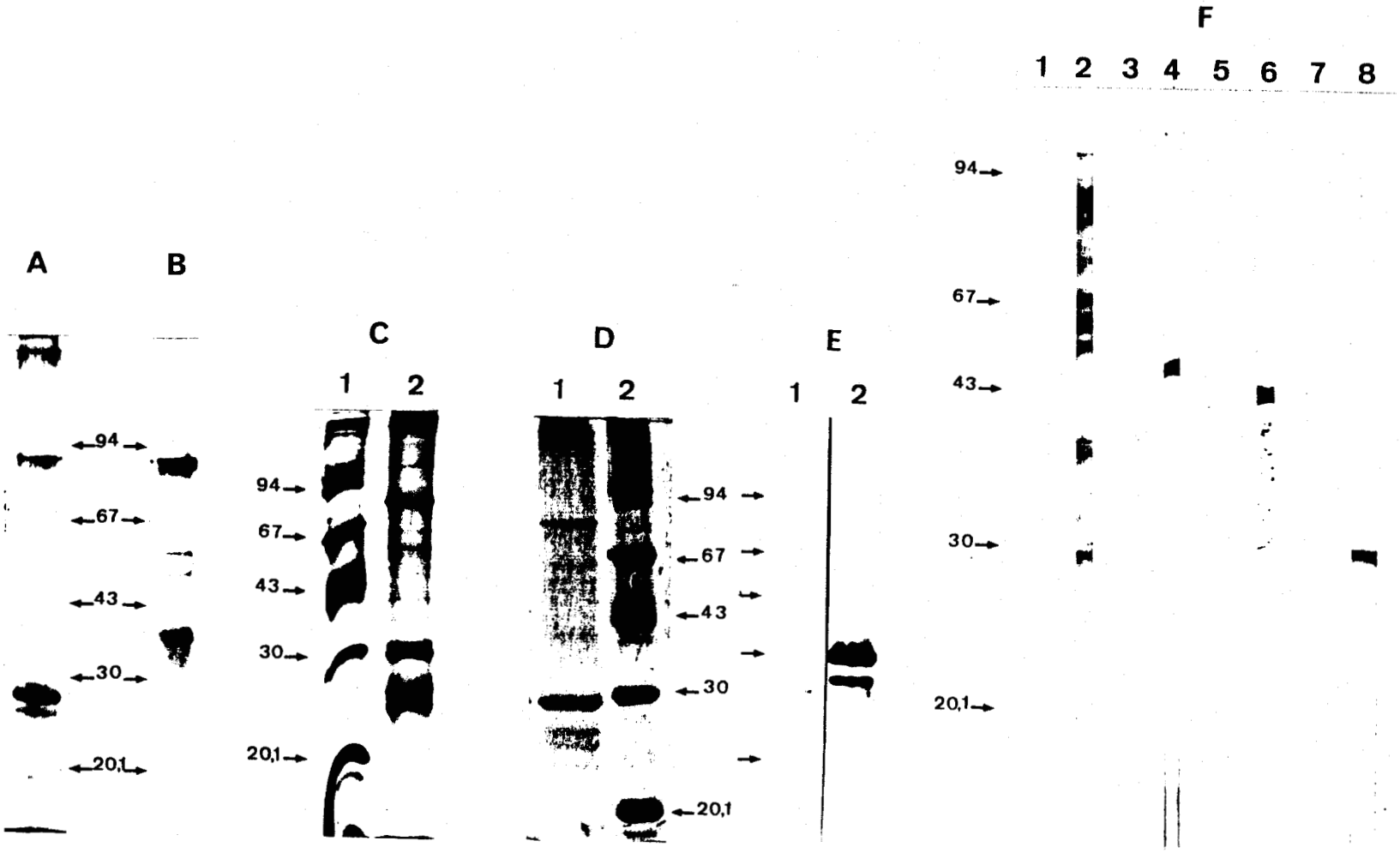

A
B
C
D
E
F
1 2 3 4 5 6 7 8
94
67
43
30
20,1

PLANCHE V

Analyses électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* obtenus après des marquages métaboliques intracellulaires.

Figures A et B: Analyse de la biosynthèse des molécules reconnues par l'AcMc T4 2F3 (pistes 1; 2 et 3) et l'AcMc T4 2F6 (pistes 4; 5 et 6) en conditions non réductrices (figure A) et en conditions réductrices (figure B). Les marquages métaboliques ont été réalisés avec le mélange des 5 acides aminés tritiés:

1 et 4: 15 mn de marquage

2 et 5: 15 mn de marquage suivi de 1 heure de chasse

3 et 6: 4 heures de marquage

Figure C: Profils électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées avec l'AcMc T4 2F3 sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* obtenus après des marquages métaboliques:

1: 6 heures en présence du mélange de 5 acides aminés tritiés

2: 6 heures en présence de la glucosamine tritiée.

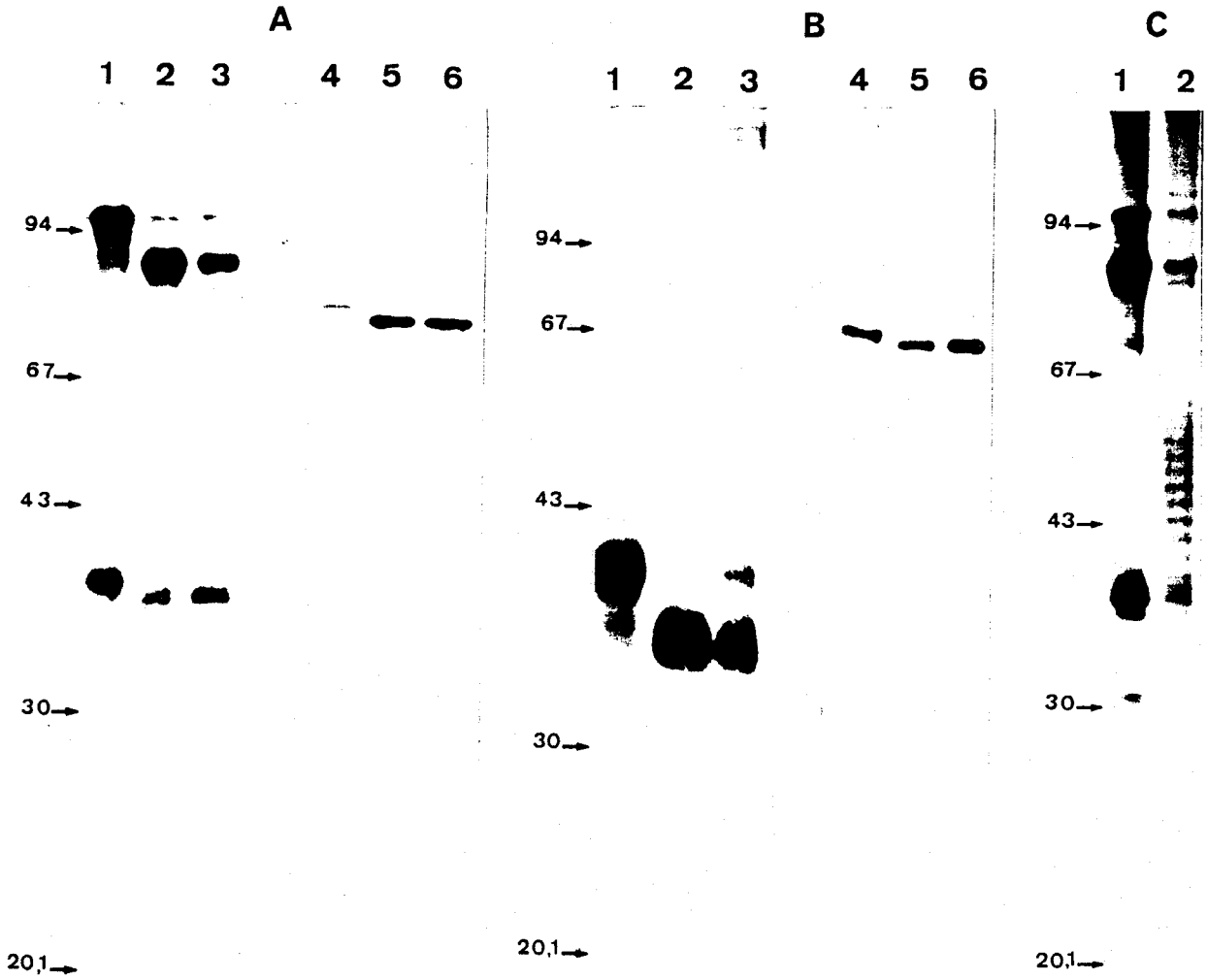

A
1 2 3 4 5 6
94
67
43
30
20,1
B
1 2 3 4 5 6
94
67
43
30
20,1
C
1 2
94
67
43
30
20,1

PLANCHE VI

Analyses électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* intracellulaires obtenus après des marquages métaboliques.

Figures A et B: Biosynthèse de la molécule reconnue par les AcMc III 3E10 et T3 4A11, en conditions non réductrices (figure A) et en conditions réductrices (figure B). Les immunoprécipitations ont été effectuées après des marquages en présence du mélange des 5 acides aminés tritiés:

1: 6 mn de marquage
2: 6 mn de marquage suivi d'une chasse de 30 mn
3: 6 mn de marquage suivi d'une chasse de 2 heures
4: 6 heures de marquage

Figure C: Biosynthèse de la molécule reconnue par le sérum de souris anti 421; analyse, en conditions non réductrices, des immunoprécipitations réalisées sur des lysats obtenus après des marquages métaboliques en présence du mélange des 5 acides aminés tritiés:

1: 15 mn de marquage
2: 15 mn de marquage suivi de 1 heure de chasse
3: 4 heures de marquage

Figure D: Profils électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées avec le sérum de souris anti 421 sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* obtenus après des marquages métaboliques intracellulaires:

1: 6 heures en présence du mélange de 5 acides aminés tritiés
2: 6 heures en présences de la glucosamine tritiée.

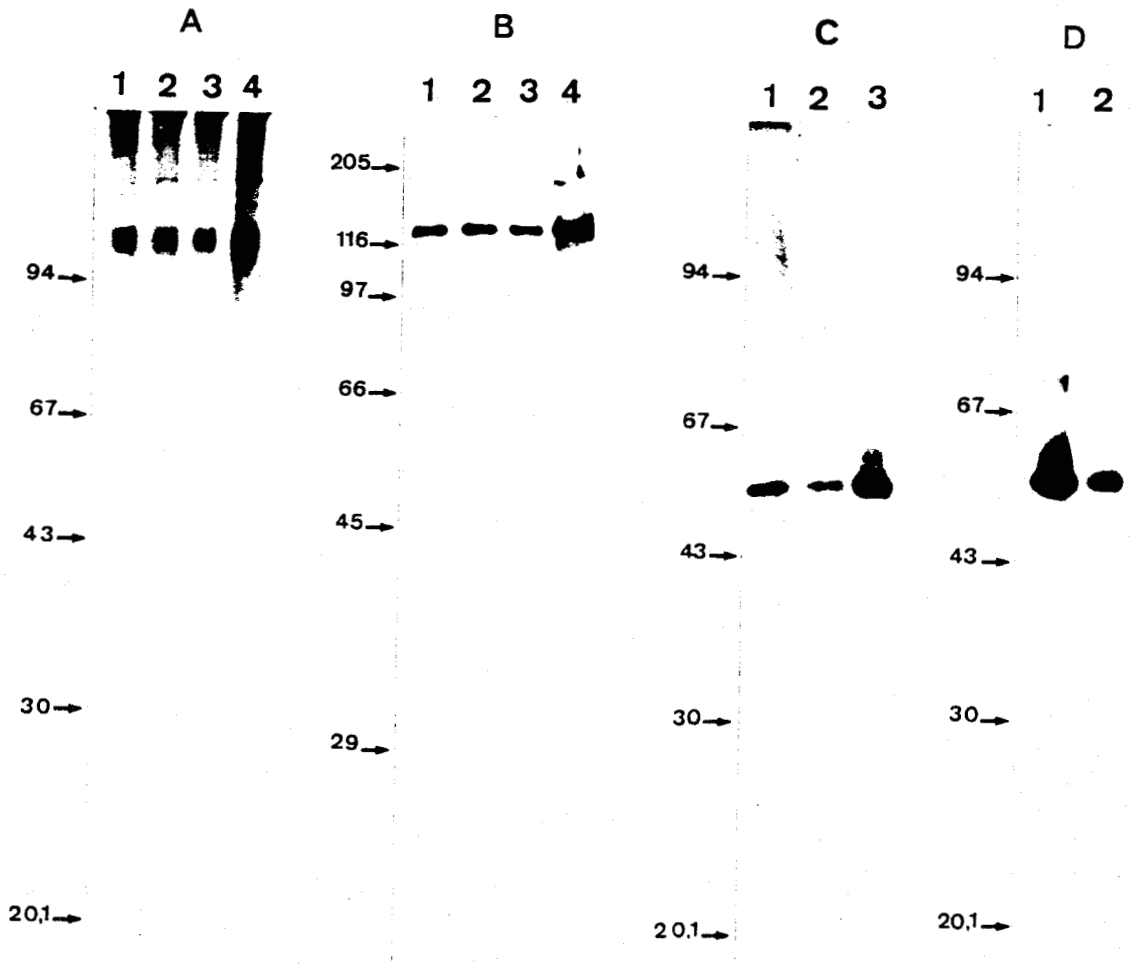

A
1 2 3 4
94
67
43
30
20,1
B
1 2 3 4
205
116
97
66
45
29
C
1 2 3
94
67
43
30
20,1
D
1 2
94
67
43
30
20,1

PLANCHE VII

Analyses électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* intracellulaires obtenus après des marquages métaboliques.

Figure A: Biosynthèse des molécules reconnues par l'AcMc T6 2H11 (pistes 1 et 2) et par l'AcMc T4 1F5 (pistes 3 et 4). Analyse en conditions non réductrices des immunoprécipitations réalisées sur des lysats obtenus après des marquages métaboliques en présence du mélange des 5 acides aminés tritiés:

1 et 3: 15 mn de marquage

2 et 4: 15 mn de marquage suivi de 1 heure de chasse

Figure B: Profils électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées avec l'AcMc T4 1F5 sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* obtenus après des marquages métaboliques:

1: 6 heures en présence du mélange de 5 acides aminés tritiés

2: 6 heures en présence de la glucosamine tritiée.

Figure C: Profils électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées avec le sérum de souris anti 205, sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* obtenus après des marquages métaboliques:

1: 6 heures en présence du mélange de 5 acides aminés tritiés

2: 6 heures en présence de la glucosamine tritiée.

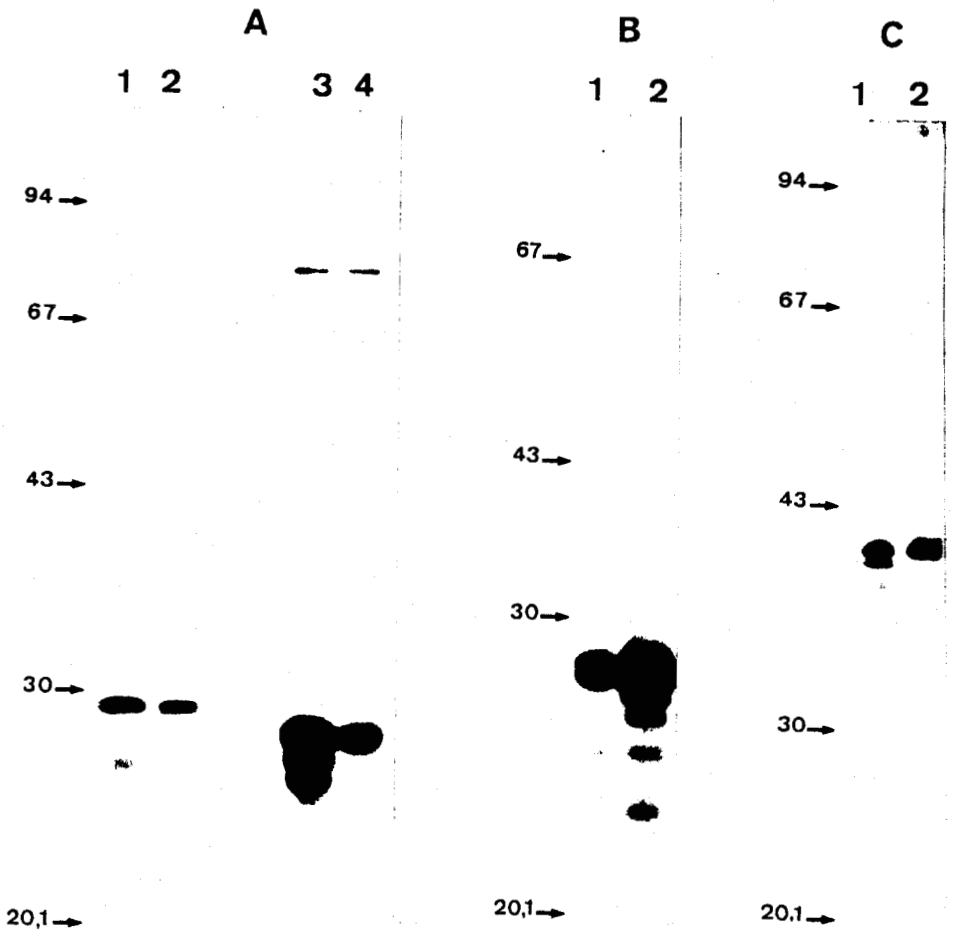

A
1 2 3 4
94
67
43
30
20,1
B
1 2
67
43
30
20,1
C
1 2
94
67
43
30
20,1

PLANCHE VIII

Analyse électrophorètique des immunoprécipitations réalisées sur des lysats de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* obtenus après des marquages métaboliques en présence du mélange des 5 acides aminés tritiés:

1: tachyzoïtes marqués 1 heure en milieu acellulaire

2: cellules Véro infestées par les tachyzoïtes marqués en milieu extracellulaire et remis en culture dans du milieu non radioactif

3: tachyzoïtes marqués en milieu extracellulaire et qui n'ont pas pénétré les cellules Véro (= surnageant de 2)

4: tachyzoïtes purifiés après 6 heures de marquage en milieu intracellulaire

5: cellules Véro infestées par les tachyzoïtes marqués en milieu intracellulaire, purifiés et remis en culture dans du milieu non radioactif

6: tachyzoïtes marqués en milieu intracellulaire, purifiés et qui n'ont pas pénétré les cellules Véro (surnageant de 5)

Figure A: Profils électrophorétiques des immunoprécipitations réalisées avec le sérum de souris anti 421

Figure B: Profils électrophorètiques des immunoprécipitations réalisées avec l'AcMc T4 2F3

Figures C et C': Profils électrophorètiques des immunoprécipitations réalisées avec l'AcMc T3 4A11

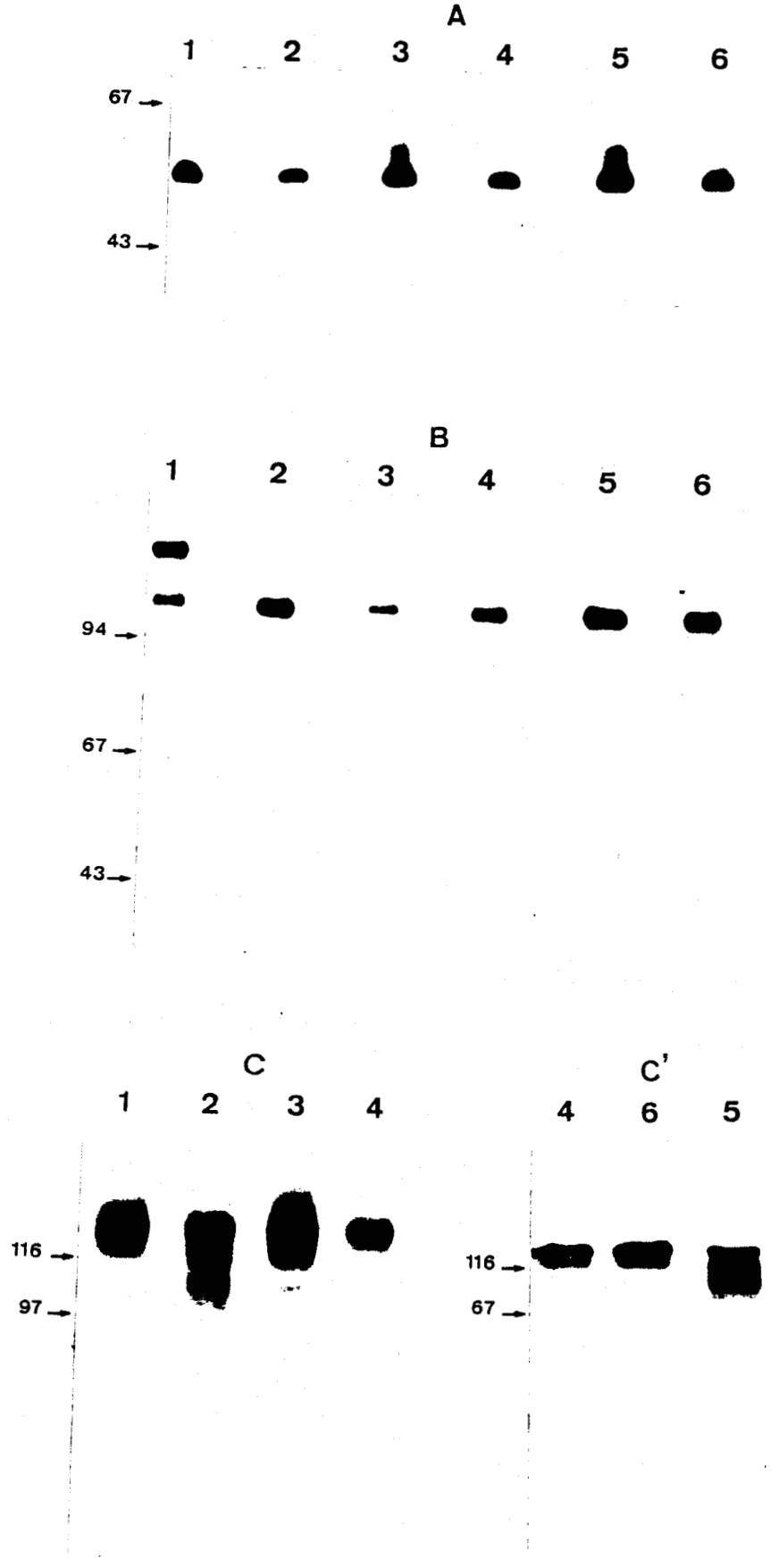

A
1
2
3
4
5
6
67
43
B
1
2
3
4
5
6
94
67
43
C
1
2
3
4
116
97
C'
4
6
5
116
67

PLANCHE IX

Essais d'immunofluorescence indirecte réalisés sur des cultures de cellules Véro et MRC5 infestées.

Figure A: Immunofluorescence indirecte réalisée avec le sérum de souris anti 421, sur des cellules Véro en culture, non infestées et non incubée en présence du surnageant du lysat des tachyzoïtes; réaction négative.

Figure B: Immunofluorescence indirecte réalisée avec le sérum de souris anti 421 sur des cellules Véro en culture, non infestées mais incubées en présence du surnageant du lysat de tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*; noter le marquage de la surface des cellules.

Figure C: Immunofluorescence indirecte réalisée avec l'AcMc T3 4A11 sur des cellules MRC5 fixées 24 heures après leur infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Sur les tachyzoïtes, le marquage est localisé au niveau de la région apicale comme on peut voir dans les vacuoles contenant un ou deux parasites. Cette région apicale est située à la périphérie des rosettes formées après la multiplication des parasites. Une diffusion du marquage est notée autour de cette région apicale.

Figure D: Immunofluorescence indirecte réalisée avec l'AcMc T6 2H11 sur des cellules Véro fixées 30 mn après leur infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Le marquage sur les tachyzoïtes est sous forme de taches intracytoplasmiques bipolaires. Noter la diffusion du marquage dans la vacuole parasitophore qui est formée après l'invasion (tête de flèche).

Figure E: Immunofluorescence indirecte réalisée avec l'AcMc T4 1F5 sur des cellules MRC5 fixées 24 heures après leur infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Le marquage correspond au matériel qui remplit l'espace entre les tachyzoïtes formant des rosettes après leurs multiplications. Les contours des vacuoles parasitophores ne sont pas marqués.

Figure F: Immunofluorescence indirecte réalisée avec l'AcMc T6 2H11 sur des cellules MRC5 fixées 24 heures après leur infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Le marquage est situé au niveau des vacuoles parasitophores, les contours de celles-ci sont également marqués.

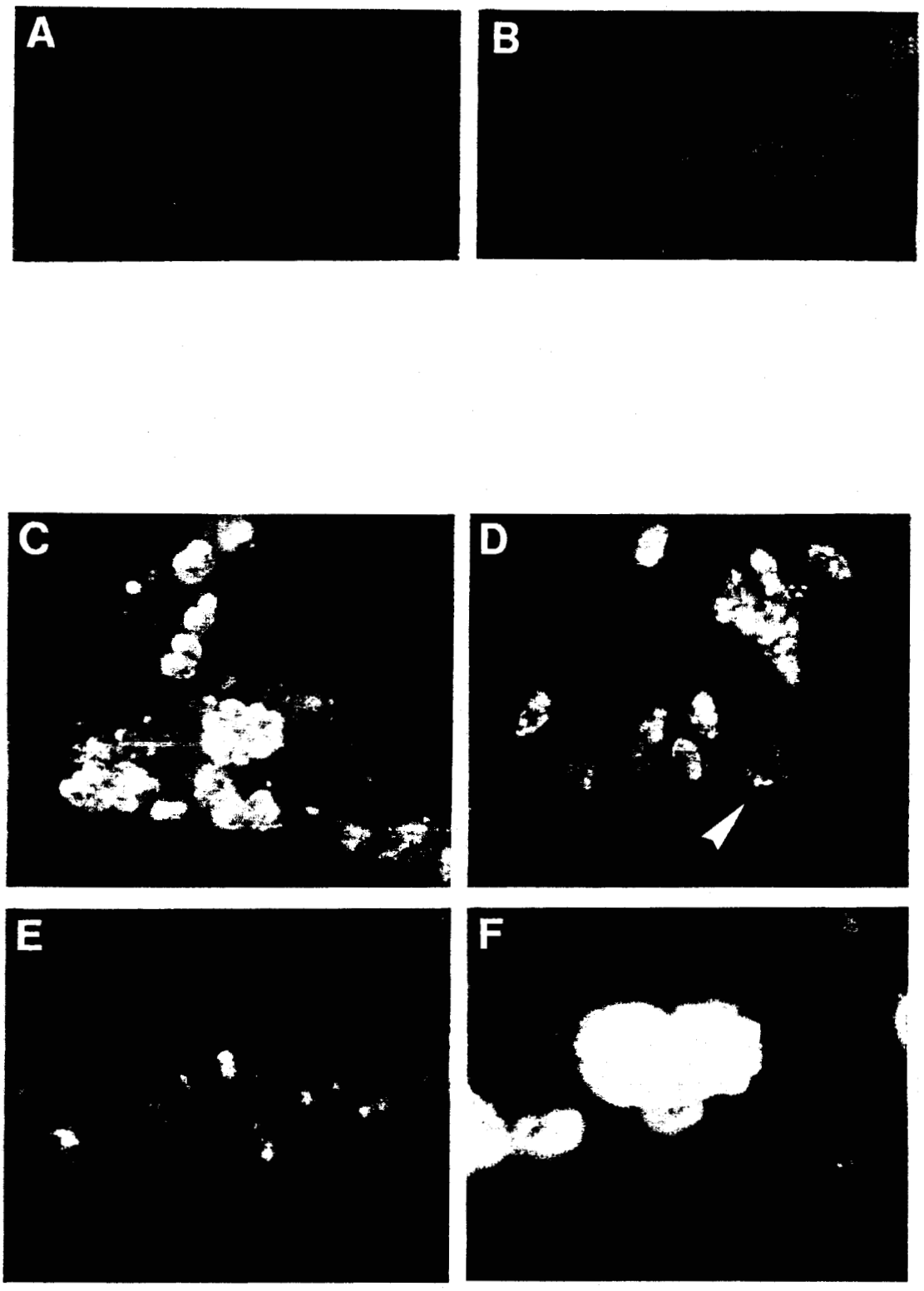

A
B
C
D
E
F

PLANCHE X

Immunolocalisations ultrastructurales sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes isolés de *Toxoplasma gondii*.

Figure A: Coupe longitudinale au niveau de l'apex d'un tachyzoïte. Marquage réalisé avec l'AcMc T4 2F6 qui reconnait le conoïde (c).
(barre = 0,1 µm).

Figure B: Coupe transversale au niveau de la région apicale d'un tachyzoïte. Marquage réalisé avec l'AcMc T3 4A11, la plupart des sections des micronèmes (m) sont marquées par des grains d'or colloïdal révélant la fixation de l'AcMc.
(barre = 0,2 µm).

Figure C: coupe longitudinale d'un tachyzoïte en division. Marquage réalisé avec le mélange des sondes anti micronèmes: l'AcMc T3 4A11, l'AcMc T4 2F3 et le sérum de souris anti 421. Les micronèmes (m) sont les seuls organites qui réagissent avec ces anticorps; ceux des cellules filles en formations sont également marqués. (n = noyau).
(barre = 0,2 µm).

Figure D: coupe longitudinale d'un tachyzoïte. Marquage réalisé avec le sérum polyclonal du lapin immunisé avec la protéine des micronèmes de 90 kDa purifiée. Les micronèmes (m) et les bulbes des rhoptries (r) sont marqués, aucun autre organite (g = granule dense; n = noyau) ne fixe les grains d'or de façon significative.
(barre = 0,5 µm).

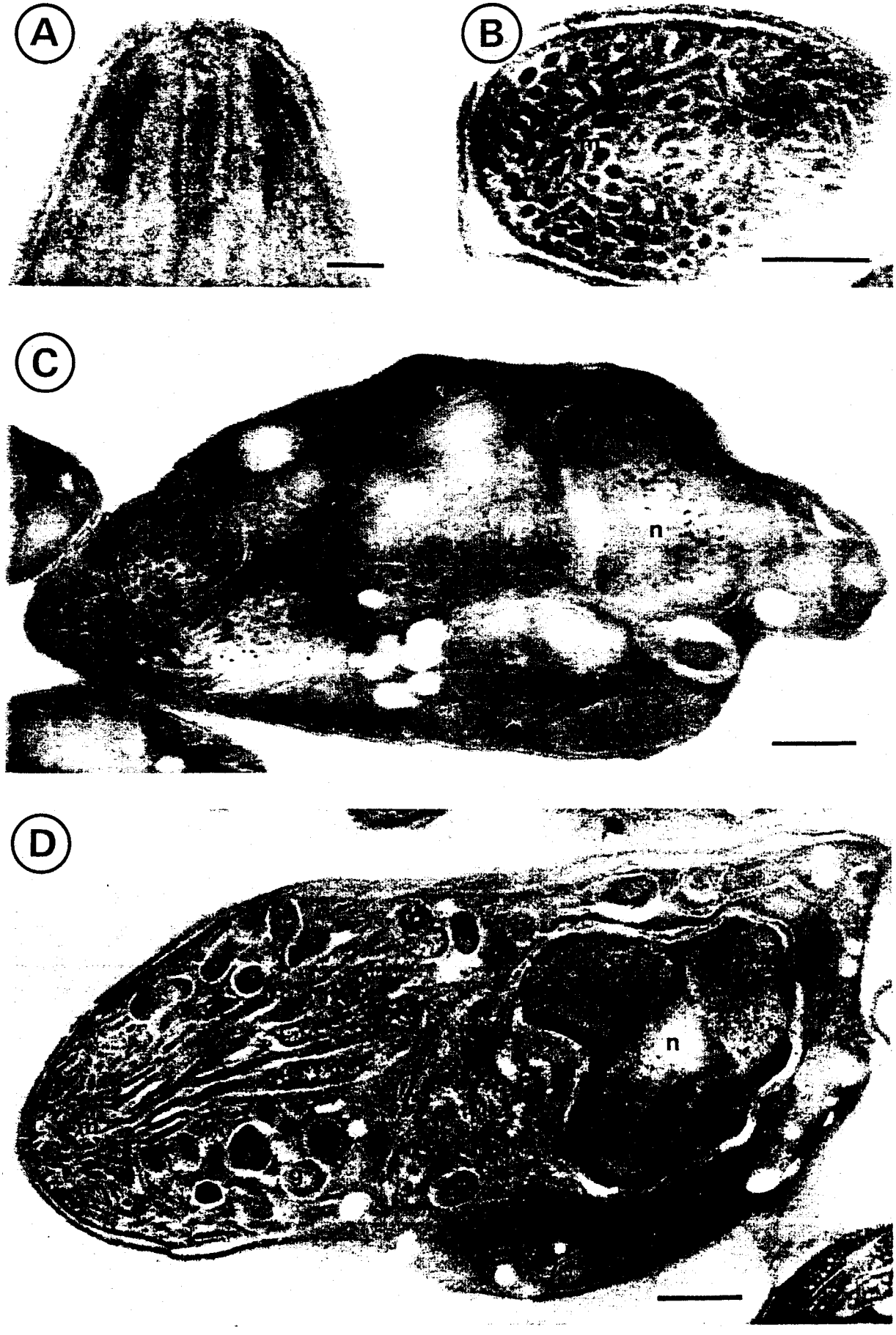

A
B
C
n
D
n

PLANCHE XI

Observations, au microscope électronique, effectuées sur des coupes ultrafines de cultures de cellules Véro fixées après l'infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*.

Figure A: Culture de cellules Véro fixées 20 mn après une infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. La coupe ultrafine (coupe parasagitale) montre l'extrémité apicale d'un tachyzoïte à la fin de l'invasion. La vésicule centrale (étoile) est une rhoptrie vide. Un granule dense décharge son contenu (astérisque) au niveau d'une interruption du complexe membranaire interne (cmi) où la membrane du granule dense est fusionnée avec le plasmalemme du tachyzoïte (pt). La membrane de la vacuole parasitophore (mvp), encore appliquée contre le tachyzoïte, est soulevée au niveau du site d'exocytose. Le matériel dense aux électrons s'étale sur les parois du tachyzoïte. (pch = plasmalemme de la cellule hôte).
(barre = 0,2 µm)

Figure B: Tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* intravacuolaire, en fin d'invasion (coupe transversale au niveau de la région apicale). La coupe montre un granule dense (g) en fin d'exocytose. (ch = cellule hôte; mi = mitochondrie; mvp = membrane de la vacuole parasitophore)
(barre = 0,4 µm)

Figures C et D: Culture de cellules Véro fixées 20 mn après une infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Immunodétection ultrastructurale réalisée avec le sérum du lapin immunisé avec la protéine de 30 kDa qui a été purifiée avec l'AcMc T6 2H11. Le marquage est localisé sur les granules denses (g) et sur le matériel dense aux électrons (flèche courbe) qui se trouve dans la vacuole parasitophore (vp). Les autres organites ne sont pas marqués (m = micronèmes; n = noyau; r = rhoptries; étoile = rhoptrie vide); la membrane de la vacuole parasitophore (mvp) n'est pas marquée non plus.
(fig. C: barre = 0,5 µm; fig. D: barre = 0,5 µm).

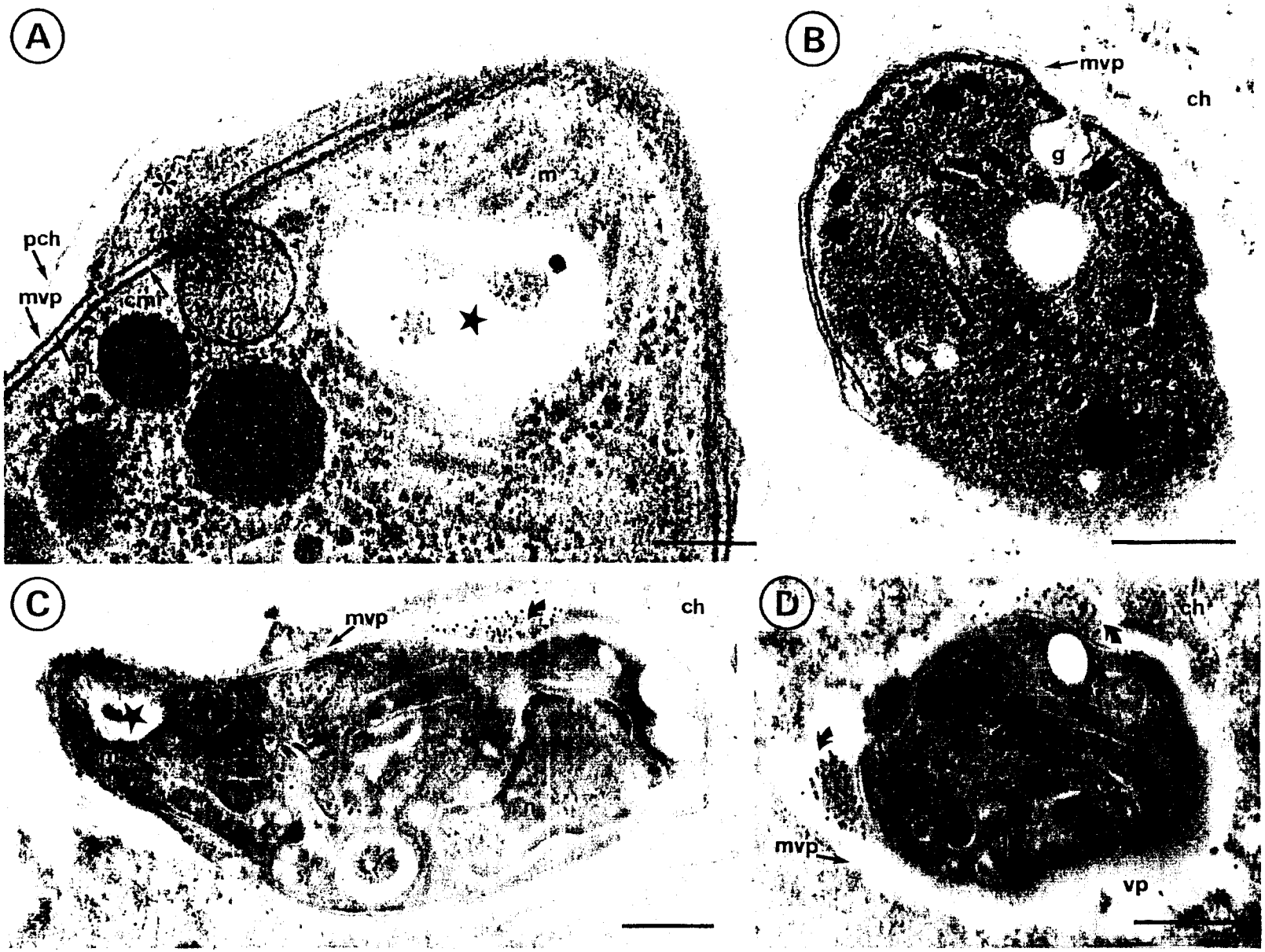

A
pch
mvp
cmf
m
B
mvp
ch
g
C
mvp
ch
D
ch
mvp
vp

PLANCHE XII

Observations au microscope électronique effectuées sur des coupes ultrafines de cultures de cellules Véro fixées après l'infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*.

Figure A: Culture de cellules Véro (ch = cellule hôte) fixées 20 mn après une infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. La coupe ultrafine montre l'extrémité postérieure d'un tachyzoïte de *Toxoplasma gondii*, à l'intérieur d'un vacuole parasitophore (vp; mvp = membrane de la vacuole parasitophore). Le réticulum endoplasmique (re) est proche de l'interruption postérieure du complexe membranaire interne (cmi) et il pourrait jouer un rôle dans la formation du réseau tubulo–membranaire intravacuolaire (astérisque).
(barre = 0,25 µm).

Figure B: Culture de cellules Véro fixées 20 mn après une infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. La coupe ultrafine intéresse un tachyzoïte intravacuolaire, creusé d'une poche à son extrémité postérieure, laquelle est remplie par le réseau tubulo–membranaire (astérisque) qui est, par endroit, en continuité avec la membrane de la vacuole parasitophore (mvp)(flèche courbe).
(ch = cellule hôte; g = granule dense; m = micronèmes; mi = mitochondrie; n = noyau; r = rhoptrie).
(barre = 1 µm)

Figure C: Cellule TG180, prélevée de la cavité péritonéale d'une souris 3 jours après l'infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Coupe ultrafine montrant une vacuole parasitophore (vp) contenant des tachyzoïtes dont certains sont en division. Deux tachyzoïtes sont reliés par leur extrémité postérieure, montrant le plan de scission (de l'apex vers l'extrémité postérieure) entre les cellules filles qui se forment à l'interieur de la cellule mère: division par endodyogénie. La vacuole parasitophore est délimitée par une membrane (mvp) qui est bordée du côté du cytoplasme de la cellule hôte (ch ; nch = noyau de la cellule hôte) par du réticulum endoplasmique (rech = réticulum endoplasmique de la cellule hôte) et des mitochondries (mich = mitochondrie de la cellule hôte). L'espace entre les tachyzoïtes est rempli par un réseau tubulo–membranaire (astérisque) et de vésicules (flèche courbe).
(barre = 2 µm)

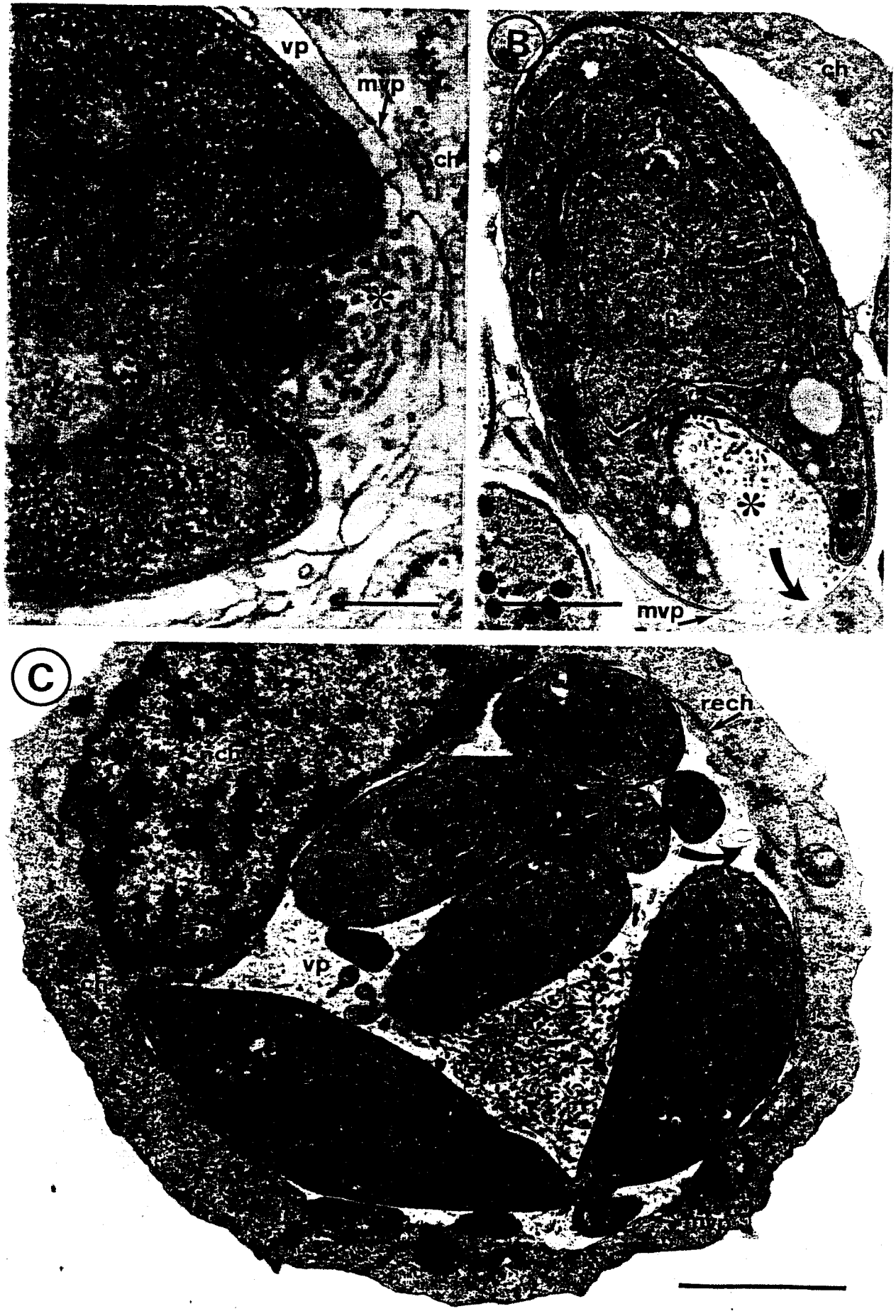

vp
mvp
ch
B
ch
mvp
C
rech
ch
vp

PLANCHE XIII

Immunolocalisations ultrastructurales réalisées sur des coupes ultrafine de cellules TG 180 infestées par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*, prélevés après 2 jours d'infestation dans la cavité péritonéale de souris.

Figure A: Immunodétection ultrastructurale réalisée avec l'AcMc T4 1F5. Les granules denses (g) sont marqués de façon significative, les autres organites ne reagissent pas avec cet anticorps (m = micronèmes; n = noyau; r = rhoptries). Le contenu de la vacuole parasitophore (vp) est marqué également (flèche courbe) mais la membrane de la vacuole parasitophore (mvp) ne l'est pas. Le reste de la cellule hôte n'est pas marqué.
(barre = 2 µm)

figure B: Immunodetection ultrastructurale réalisée avec l'AcMc T6 2H11. Le marquage obtenu sur les tachyzoïtes et dans la vacuole parasitophore correspond à celui de la figure A obtenu avec l'AcMc T4 1F5 tout comme avec les autres sondes qui réagissent avec les granules denses. La particularité de cet AcMc (T6 2H11) par rapport aux autres sondes, est sa réactivité avec la membrane de la vacuole parasitophore (tête de flèches)
(barre = 1 µm)

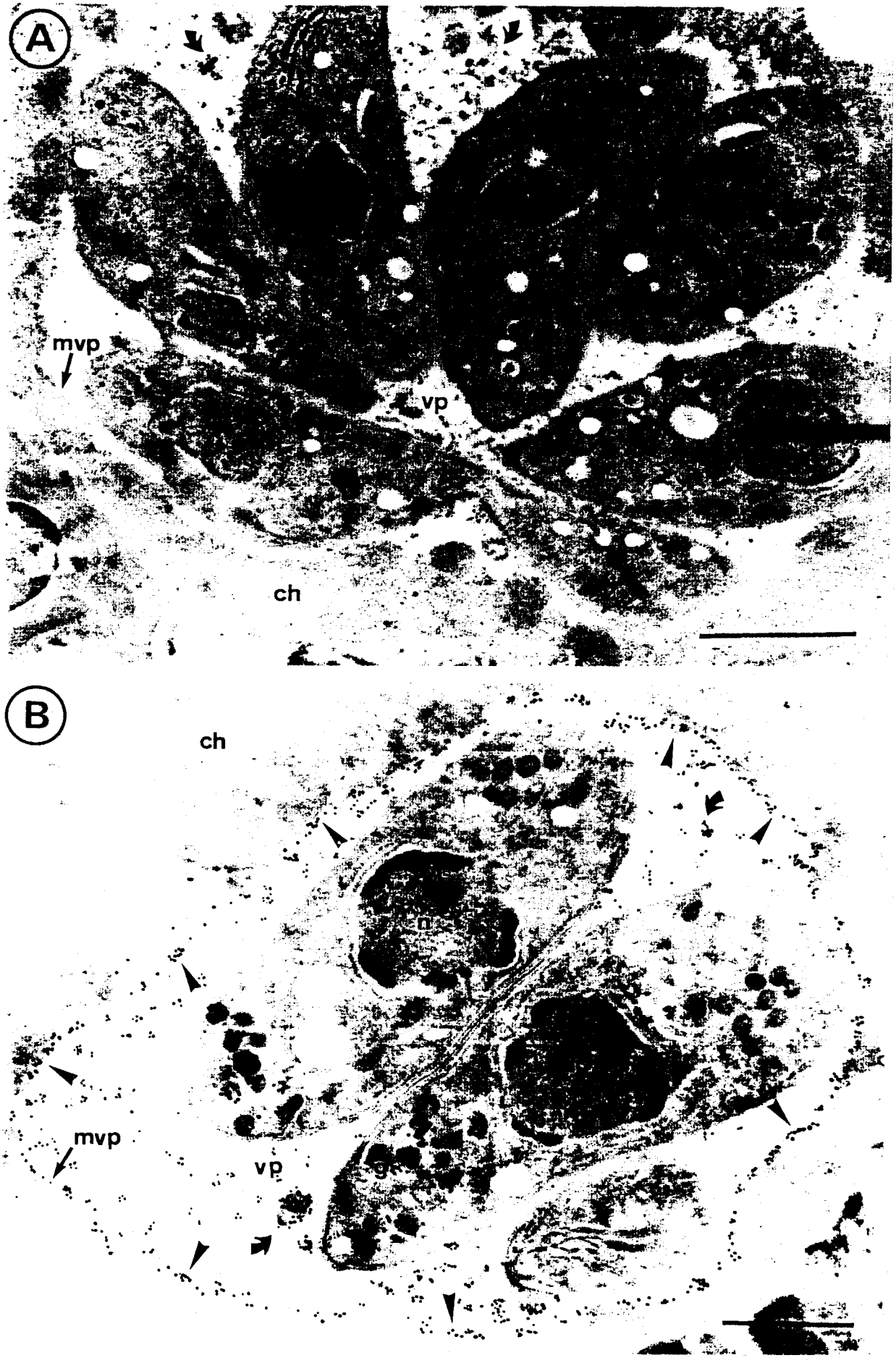

A
mvp
vp
ch
B
ch
n
mvp
vp
g

PLANCHE XIV

Immunolocalisations ultrastructurales réalisées sur des coupes ultrafines de cellules TG180 infestées par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* et sur des kystes de la souche 76 K prélevés du serveau de souris infestée.

Figure A: Immunodétection ultrastructurale réalisée avec le sérum du lapin immunisé avec la protéine de 30 kDa purifiée, sur une coupe ultrafine de cellule TG180, prélevée de la cavité péritonéale de souris et fixées 3 jours après l'infestation par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Le marquage obtenu est identique à celui que produit l'AcMc T6 2H11 ayant sérvi pour la purification de la protéine.
(barre = 1 µm)

Figure B: Immunodétection ultrastructurale réalisée avec le sérum du lapin immunisé avec la protéine de 30 kDa purifiée, sur une coupe ultrafine d'un kyste (souche 76 K de *Toxoplasma gondii*). Les grains d'or colloïdal révélent la fixation des anticorps sur les granules denses (g) des bradyzoïtes mais pas sur les autres organites (a= amylopectine; m = micronèmes, r = rhoptries). La paroi kystique (pk) est également reconnue (têtes des flèches).
(barre = 1 µm)

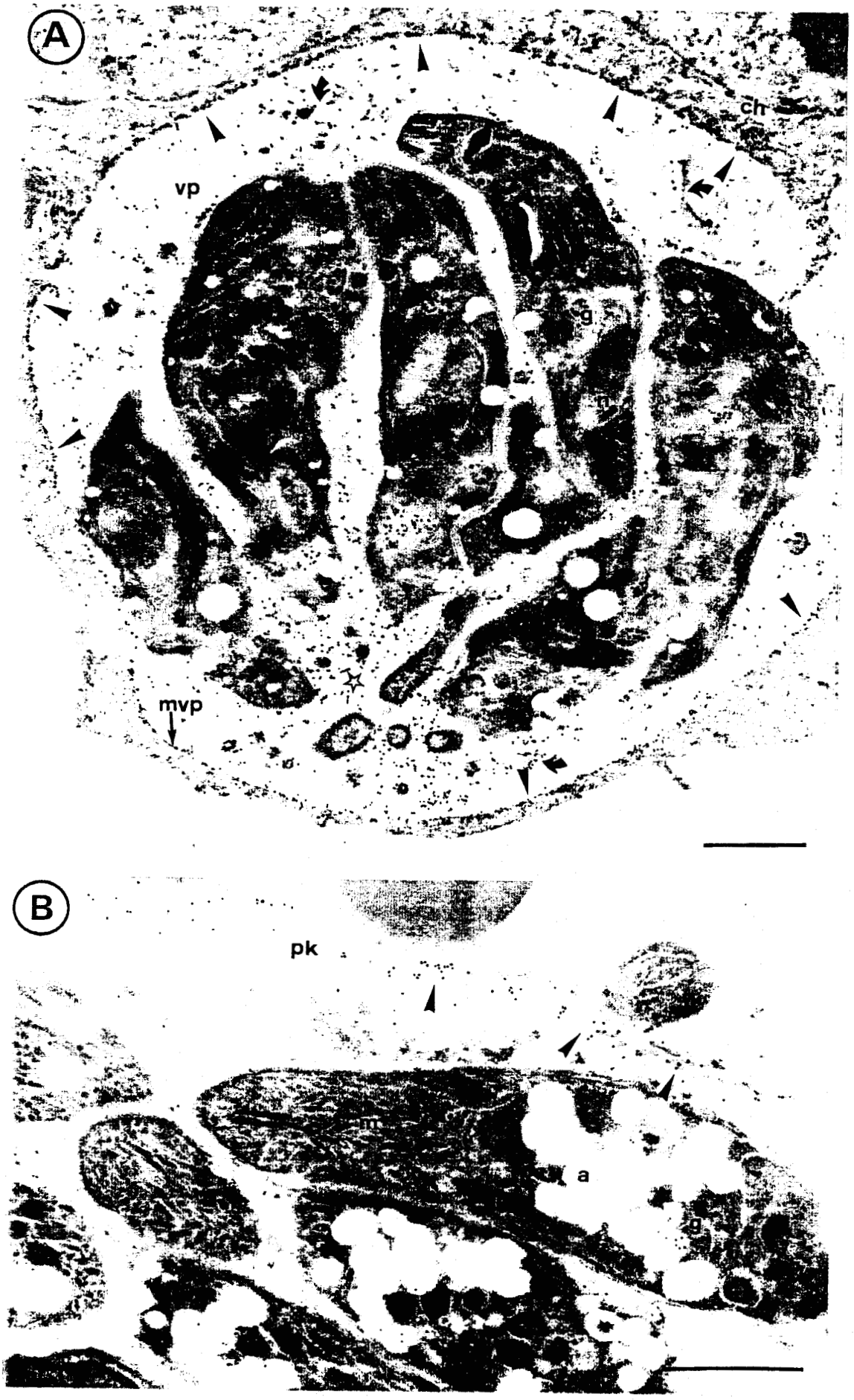

A
ch
vp
g
mvp
B
pk
a

PLANCHE XV

Immunolocalisations ultrastructurales réalisées sur des coupes ultrafines de cellules TG180 infestées par des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* et prélevées après deux jours d'infestation dans la cavité péritonéale de souris.

Figure A: Double marquage effectué avec le sérum de souris anti 205 (révélé par des grains d'or colloïdal de 5 nm) suivi de l'AcMc T6 2H11 (révélé par des grains d'or colloïdal de 15 nm). Les deux sondes réagissent avec les granules denses (g) des tachyzoïtes (t) et ne reconnaissent pas les autres organites (m = micronèmes; n = noyau; r = rhoptries). Dans la vacuole parasitophore (vp) les deux types de grains d'or colloïdal révèlent la réactivité des deux sondes avec le réseau tubulo–membranaire (flèche courbe). Sur la membrane de la vacuole parasitophore (mpv), seuls les grains d'or de 15 nm sont fixés (têtes de flèches) indiquant la réactivité avec l'AcMc T6 2H11 uniquement.
(barre = 1 µm)

Figure B: Détail du grand cadran de la figure A, montrant la réactivité des granules denses et du réseau tubulo–membranaire.
(barre = 0,2 µm)

Figure C: Détail du petit cadran de la figure A, montrant la réactivité au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore.
(barre = 0,2 µm)

A
ch
vp
mvp
B
vp
C
mvp
ch
vp

ANNEXE

(PUBLICATIONS)

Molecular and Biochemical Parasitology, 47 (1991) 223–234

© 1991 Elsevier Science Publishers B.V. / 0166-6851/91/$03.50
ADONIS 016668519100248D

MOLBIO 01566

Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*

Abderrahim Achbarou[1], Odile Mercereau-Puijalon[2], Jean Michel Autheman[3], Bernard Fortier[1], Daniel Camus[1] and Jean François Dubremetz[1]

[1]*Unité 42 INSERM, Villeneuve d'Ascq;* [2]*Unité de Parasitologie Expérimentale, Institut Pasteur, Paris; and* [3]*Pasteur Mérieux, Serums et Vaccins, Marcy l'Etoile, France*

(Received 31 October 1990; accepted 19 March 1991)

Three microneme proteins of *Toxoplasma gondii* have been characterized using 3 monoclonal antibodies and a recombinant protein specific antiserum. In all cases, apical labeling of tachyzoites and bradyzoites was observed by indirect immunofluorescence assay. Immunogold localization on ultrathin sections of bradyzoites or tachyzoites showed a specific labeling of micronemes. The following proteins were characterized using 2-dimensional gel electrophoresis and Western immunoblotting: Mic 1 (60 kDa, Pi 6.5), Mic 2 (120 kDa, Pi 5) and Mic 3 (90 kDa, Pi 6.75). The 90-kDa protein (Mic 3) is a heterodimer of two 38-kDa polypeptides (Pi 6.7 and 6.75 respectively) linked by disulfide bridges. Metabolic labeling and immunoprecipitation assays showed that at least one of the 38-kDa polypeptides was processed from a 40-kDa precursor. No processing was observed during the biosynthesis of the 120- and 60-kDa polypeptides.

Key words: *Toxoplasma gondii*; Microneme; Metabolic labeling; Immunoelectron microscopy; Recombinant protein

Introduction

Host cell invasion by sporozoan zoites is an active process that leads to parasite internalization in a new membrane-bounded intracellular compartment named the parasitophorous vacuole. Apical organelles of the zoite (rhoptries, dense granules and micronemes) characteristic and common to all Sporozoa, play a key role in host cell invasion and vacuole formation. In *Toxoplasma gondii*, rhoptry and dense granule contents and fate have been partly characterized [1–8]. In contrast, no data have been published on *T. gondii* micronemes. These organelles were first considered as precursors of rhoptries or as cross-sections of rhoptry peduncles [9]. In other Sporozoa, micronemes have been clearly shown to be distinct from other organelles: they were isolated and characterized in *Sarcocystis tenella* [10], *Sarcocysitis muris* [11] and *Eimeria nieschulzi* [12]. In *Plasmodium knowlesi* [13], *Plasmodium berghei*, *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium brasilianum* [14] sporozoites, micronemes have been shown to contain circumsporozoite protein (CSP) related antigens. In *P. knowlesi*, the Duffy receptor family has been located in micronemes of erythrocytic stage merozoites [15]. In *P. brasilianum*, cross-reactivities have been found between micronemes and host cell caveolae and knobs leading Torii et al. [16] to suggest that microneme contents are transferred to the host cell membrane at the time of invasion. Microneme exocytosis has also been reported in *S. muris* (Entzeroth, personal communication). It was therefore important to analyze these organelles in *T. gondii*. During the production of monoclonal antibodies and recombinant proteins, we have obtained specific probes which enabled us to characterize *T. gondii* microneme proteins.

Correspondence address: A. Achbarou, Unité 42 INSERM, B.P. 39, 59651 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Abbrevations: DTT, dithiothreitol; IFA, immunofluorescence assay; mAb, monoclonal antibody; NP 40, Nonidet 40; PBS, phosphate-buffered saline; Pi, isoelectric point; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; 2D-electrophoresis, 2-dimensional electrophoresis.

Materials and Methods

Parasites. Two strains of *T. gondii* have been used in this study: RH [17] and 76K [18]. The 76K strain was used for the production of bradyzoites. It was passaged every 3 months by oral injection of cysts collected from the brain of infected animals. When required, cysts were purified from infected brain by centrifugation through Percoll [19]. The RH strain was used for the production of tachyzoites, and was maintained by serial passage in the peritoneal cavity of Swiss mice. Mass production of tachyzoites was achieved by intraperitoneal injection with TG 180 sarcoma cells [20]. Parasites were also grown in vitro on monolayers of Vero or MRC5 cells, maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 5% (Vero) or 10% (MRC5) fetal calf serum. When required, tachyzoites were purified by glass wool filtration [21].

Monoclonal antibodies. MAbs T3 4A11 and T4 2F3 were isolated during the screening of hybridomas produced against *T. gondii* as described elsewhere [4, 22]. MAb III3E10 was obtained independently using similar procedures (Autheman, unpublished).

Antibody production against recombinant proteins. Antibodies were raised in mice against recombinant proteins encoded by part of a *T. gondii* gene. The construction of the *T. gondii* genomic library, screening assays and recombinant protein production will be described in detail elsewhere (Mercereau-Puijalon et al., in preparation). Briefly, *T. gondii* genomic DNA (RH strain) was inserted in bacteriophage λgt11, and expressed as β-galactosidase fusion proteins, that were identified using affinity purification of rabbit anti-*T. gondii* antibodies reacting on Western blots and in immunofluorescence assays on tachyzoites. One recombinant phage (421) was shown to contain part of the gene coding for a protein located in the apical area of zoites by IFA. The corresponding DNA fragment was inserted into a pMSgt plasmid that was used to produce a recombinant protein with β-galactosidase activity. The protein was then purified on a column of *p*-amino-phenyl-β-D-thiogalactoside Sepharose according to Ullman [23]. Mice were injected intraperitoneally every 2 weeks with 40 μg of protein emulsified in Freund's complete (first injection) and incomplete (from second injection onward) adjuvants; sera were collected after the third injection.

Immunofluorescence assay. RH tachyzoites or 76K bradyzoites (purified as described above) were washed 3 times with PBS and dried on standard IFA slides, which were stored at −20°C. IFA was performed at 37°C after 10 min fixation in cold acetone (−20°C). After incubation for 30 min with mAb or serum (1:25 to 1:100 dilutions in PBS), slides were washed and incubated with a 1:50 dilution of fluorescein-conjugated rabbit anti-IgG antibodies. For IFA on intracellular tachyzoites, cells were grown on microscope slides equipped with Flexiperm chambers (Heraeus); they were infected with tachyzoites, and fixed 15 min, 6 h or 24 h later. Cells were fixed with 2% formaldehyde in PBS during 30 min, washed with PBS, and permeabilized in acetone at −20°C. Incubations were performed at room temperature (20°C) with ascitic fluids or sera diluted 1:100, followed by fluorescein-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies.

Immunoelectron microscopy. TG 180 cells infected by tachyzoites, or purified cysts were fixed with 4% formaldehyde and 0.05% glutaraldehyde in PBS for 15 min, dehydrated in ethanol and embedded in LR white (London Resin Co). Thin sections were collected on parlodion-carbon coated nickel grids and floated for 30 min on 2.5% non-fat dry milk and 0.1% Tween 20 in PBS (PBS-milk-Tween). The grids were saturated for 1 h with 500 μg ml^{-1} protein A in PBS, transferred successively for 1 h each on dilutions of mouse ascitic fluid or serum, of anti-mouse IgG-IgM rabbit antibodies and of protein A-gold (5 or 8 nm) in PBS-milk-Tween. In some cases incubation with mouse ascitic fluid was extended to 16 h. Sections were stained with 4% uranyl acetate in water and observed with an Hitachi HU600 electron microscope.

Metabolic labeling of cultures. A 75 cm^2 monolayer of Vero cells that had been infected 24 h earlier with 5×10^7 tachyzoites isolated from mouse peritoneal fluid was washed with leucine-lysine-phenylalanine-proline-tyrosine-free RPMI me-

dium (Gibco selectamine kit) supplemented with 5% dialyzed fetal calf serum and incubated for 4 h at 37°C in 20 ml of the same medium containing 200 μCi of tritiated amino acid mixture (L-[4,5-^{3}H]leucine: 163 Ci mmol^{-1}; L-[4,5-^{3}H]lysine: 95 Ci mmol^{-1}; L-[2,3,4,5,6,-^{3}H]phenylalanine: 129 Ci mmol^{-1}; L-[2,3,4,5-^{3}H]proline: 105 Ci mmol^{-1}; L-[2,3,4,5,6-^{3}H]tyrosine: 92 Ci mmol^{-1}, Amersham). At the end of the labeling period, the medium was removed and the infected cells were lysed for immunoprecipitation experiments. In pulse chase experiments, 25 cm^2 infected cell monolayers were labeled in the same conditions for 15 min, followed by either immediate lysis or chase in complete culture medium at 37°C for 30 min, 1 h or 2 h before lysis.

Immunosorbent production. MAb immunoglobulins were purified from ascitic fluid by ion exchange chromatography on DEAE-Trisacryl (IBF) and coupled to CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) at a ratio of 10 mg ml^{-1} of gel using the manufacturer's recommended method. Immunoglobulins from mouse immune sera were adsorbed on rabbit anti-mouse IgG adsorbed on Protein A-Sepharose-CL 4B (Pharmacia).

Immunosorption procedure. Labeled material was collected with 400 µl of NET (Tris-HCl 50 mM pH 8.3/ NaCl 150 mM/ EDTA 2 mM/ aprotinin 0.1 mg ml^{-1}/ leupeptin 0.01 mg ml^{-1}/ phenylmethysulfonyl fluoride 1 mM), supplemented with 100 µl of 5% SDS, vortexed and supplemented with 500 µl of NET containing 2% Triton X-100 and 2% deoxycholate. After agitation for 30 min at room temperature, the lysate was centrifuged at 10 000 × g for 10 min and the supernatant collected for immunosorption. The immunosorbents were incubated with lysate at room temperature for 2 h under gentle agitation, and washed 6 times with a buffer containing 1 M NaCl/ 0.5% Nonidet 40 (NP 40) in 50 mM Tris-HCl pH 8.3. Elution was then performed during 5 min at 95°C with electrophoresis sample buffer.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. SDS-PAGE was performed according to Laemmli [24] using a 12% separating gel. Molecular weight markers (Pharmacia, LMW kit; Sigma MW-SDS-200 kit) were used for calibration. Gels were stained with Coomassie blue R, then processed for fluorography [25] and exposed to Kodak X-Omat AR film at −80°C.

Two-dimensional electrophoresis. The procedure was derived from O'Farrell [26] and Ducan and Hershey [27]. Samples (tachyzoite lysates or eluates of immunosorbents after immunoprecipitation) were dissolved in 0.3% SDS/ 3% NP 40/ 2% ampholines (Servalyt, 3–10)/ 9.5 M urea. The first dimension was run in cylindrical isoelectrofocusing gels containing 3.5% acrylamide/ 2% NP 40/ 2% ampholines (Servalyt 3–10)/ 9.8 M urea at 8000 V for 16 h. One gel was used for pH gradient determination by cutting the gel in 2-mm pieces, soaking the pieces in distilled water and measuring the resulting pH. The second dimension was run in SDS-PAGE as described above.

Western blotting. Tachyzoites of the RH strain or purified cysts of the 76K strain were analyzed by SDS-PAGE and electrophoretically transferred to nitrocellulose [28]. The nitrocellulose sheet was saturated for 30 min in 5% non-fat dry milk in 15 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.05 Tween 20 buffer (TNT). It was then incubated in antibody (mouse ascitic fluid or serum diluted 1:500 in TNT) for 1 h at room temperature. After washing, the sheet was incubated in alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG diluted 1:7500 in TNT, and developed with 5-bromo, 4-indolyl phosphate and nitroblue tetrazolium.

Results

Microneme specific antibodies were first selected based on apical fluorescence in IFA. Among the antibodies producing this pattern, 3 mAbs and 1 serum raised against a recombinant protein were further found to react with micronemes by immunoelectron microscopy.

The IFA pattern of these antibodies was restricted to the tip of tachyzoites (Fig. 1) and was clearly distinct from the pattern obtained with rhoptry specific mAbs such as T4 4A7 [4]. Similar IFA patterns were obtained on bradyzoites with these antibodies. When IFA was performed on tachyzoite-

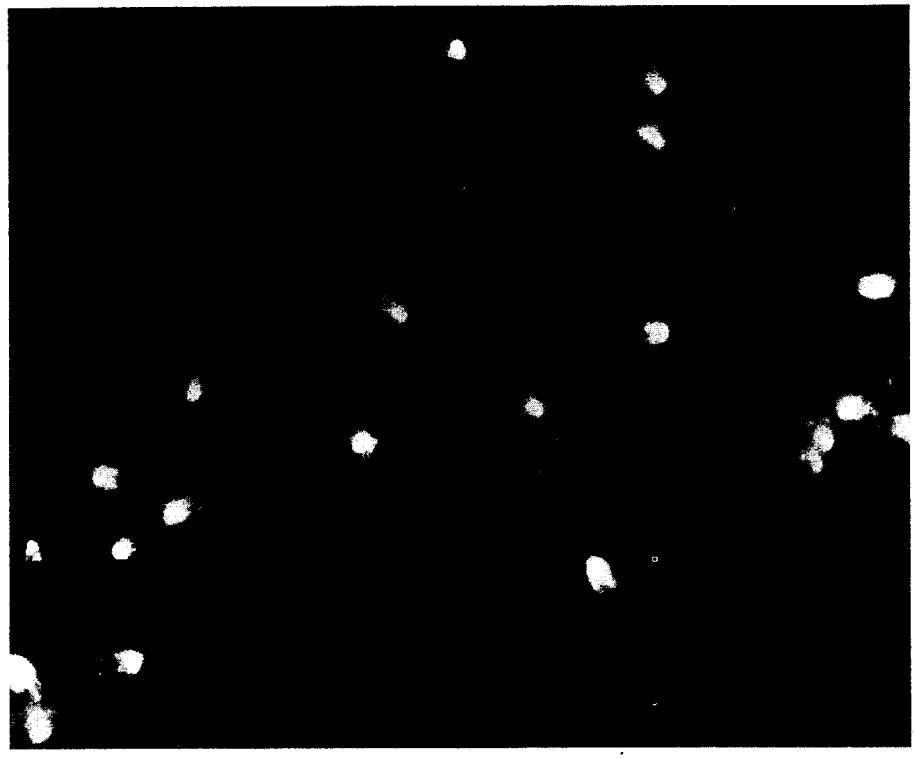


Fig. 1. Immunofluorescence with mAb T4 2F3 on tachyzoites of *T. gondii*. The labeling is restricted to the tip of the zoites. An identical pattern was observed with mAbs T3 4A11, III3E10 or mouse serum anti-recombinant protein 421, both on tachyzoites and bradyzoites.

infected monolayers of Vero or MRC5 cells, we found the apical fluorescence on parasites fixed shortly after invasion (15 min). During intracellular multiplication the apical labeling was always found, but a posterior diffusion of labeling was observed one some of the multiplying parasites (Fig. 2a).

Immunoelectronmicroscopy performed with each one of these antibodies on tachyzoites (Fig. 2b,c and d; Fig. 3a) or on bradyzoites (Fig. 3b), showed gold particles only on electron-dense anterior organelles 30 × 150 nm in size, identified as micronemes. The labeling was not found on all micronemes. No other structure in parasites, parasitophorous vacuole or host cell was labeled.

On immunoblots of tachyzoites and bradyzoites, mAbs T3 4A11 and III3E10 reacted with a wide band migrating slightly slower than the 94-kDa marker on non-reduced samples (Fig. 4A1; Fig. 4A2); when electrophoresis was performed in reducing conditions, a 120-kDa major protein and 116- and 110-kDa minor ones were detected (Fig. 4B1; Fig. 4B2). The isoelectric point (Pi) of the 120-kDa protein was 5 and the Pi of both the 116- and the 100-kDa proteins was 5.95 as determined by Western blot after 2D-electrophoresis (Fig. 5a). Only a 120-kDa protein was immunoprecipitated after metabolic labeling of tachyzoites with [^{3}H]AA mixture (or [^{35}S]methionine, data not shown) when using an immunosorbent prepared with mAb III3E10. No difference was found between 15 min pulse, and the same pulse followed by either 30 min or 2 h chase (Fig. 6C).

Sera from mice immunized with recombinant protein 421, reacted in Western blot with a 50-kDa protein on unreduced samples (this value was obtained by comparison with a 60-kDa rhoptry protein [4] since the albumin standard is not accurate in those conditions) (Fig. 4A4); upon reducing conditions, this protein migrated at 60 kDa (Fig. 4B4). Identical patterns were obtained with bradyzoites and tachyzoites. Immunoprecipitation of meta-

Fig. 2. (a) Immunofluorescence with mAb T3 4A11 on intracellular (MRC5) *T. gondii* tachyzoites (24 h after monolayer infection). The labeling found on the tip of parasites tended to diffuse posteriorly in some of the parasites undergoing multiplication; (b) Immunolocalization with mAb T3 4A11 on ultrathin section of *T. gondii* tachyzoites. Apical section of a zoite with labeling of several microneme sections (bar = 0.2 μm); (c) Immunolocalization with mAb T4 2F3 on *T. gondii* tachyzoites. Protein A-gold labeling is restricted to micronemes section in the apical area (bar = 0.5 μm). (d) Enlargement of this apical area (bar = 0.25 μm). g, dense granules; n, nucleus; r, rhoptries.

Fig. 3 (a) Immunolocalization with serum anti-recombinant protein 421 on ultrathin section of *T. gondii* tachyzoites (bar = 0.25 μm). (b) Immunolocalization with mAb T4 2F3 on ultrathin section of *T. gondii* bradyzoites (bar = 0.35 μm). a, amylopectin; c, conoid; g, dense granules; m, micronemes; r, rhoptries.

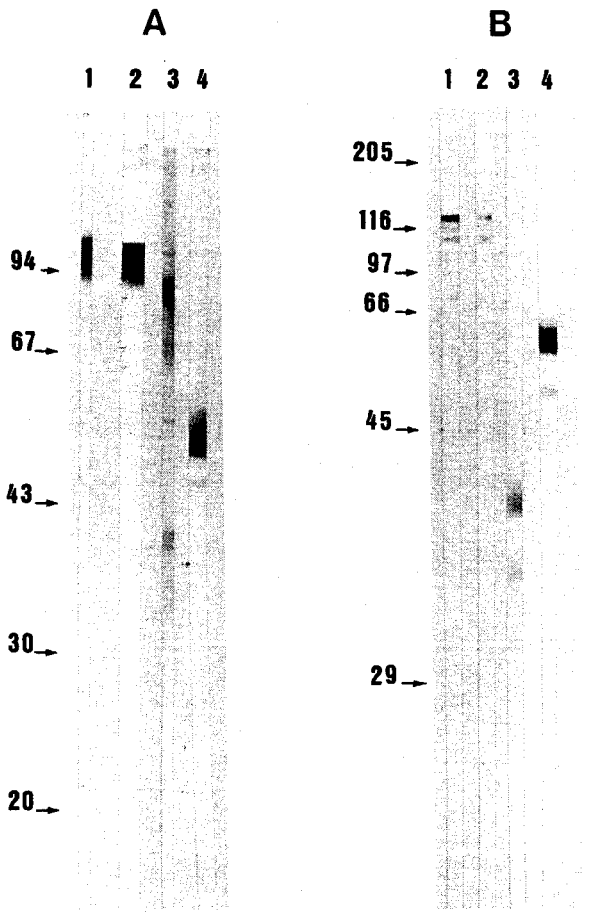


Fig. 4. Immunoblotting of *T. gondii* tachyzoites probed after SDS-PAGE in non-reducing conditions (A), and reducing conditions (B); lanes 1, mAb T3 4A11; lanes 2, mAb III3E10; lanes 3, mAb T4 2F3; lanes 4, serum anti-421. The apparent molecular weights ($\times 10^{-3}$) of standard proteins are given (Pharmacia LMW kit, Sigma MW-SDS-200 kit).

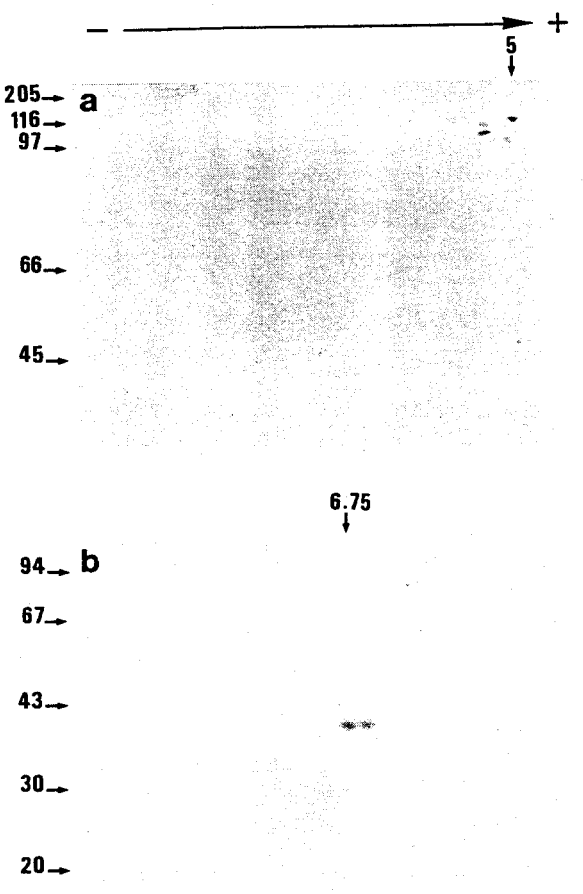


Fig. 5. Immunoblotting of *T. gondii* after 2D-electrophoresis in reducing conditions with (a) mAb T3 4A11 and (b) mAb T4 2F3. The apparent MW ($\times 10^{-3}$) of standard proteins are given (Pharmacia LMW kit, Sigma MW-SDS-200 kit).

bolically labeled tachyzoites by this serum after 15 min pulse, chase or 4 h labeling showed one radioactive band comigrating with the one detected by Western blot (Fig. 6B). A Pi of 6.5 was determined on autoradiography of 2D-electrophoresis of the antigen radiolabeled by a 4 h incubation of tachyzoites with [^{3}H]AA mixture (Fig. 7a).

On immunoblot of non-reduced tachyzoite lysates, the T4 2F3 mAb identified a 90-kDa major protein and minor ones at 100 and about 38 kDa (Fig. 3A3). After reduction, only one major 38-kDa band was found together whith a minor one at 34 kDa (Fig. 4B3). A Pi of 6.75 was determined for the 90-kDa molecule. When the sample was reduced before isoelectric focusing, two 38-kDa proteins were identified at Pi 6.75 and 6.7 respectively (Fig. 5b). With lysates of tachyzoites metabolically labeled during a 15 min pulse, this mAb immunoprecipitated a major 98-kDa and a minor 40-kDa protein in non-reducing conditions (Fig. 6Aa1), or only a 40-kDa protein in reducing conditions (Fig. 6Ab1). When a one h chase was performed after a 15 min pulse, a major 90-kDa and minor 38- and 100-kDa (non-reduced) (Fig. 6Aa2), or a 38-kDa (reduced) (Fig. 6Ab2) were immunoprecipitated. The immunoprecipitation pattern did not differ significantly after 4 h labeling (Fig. 6Aa3 and Fig. 6Ab3). The Pi of the 90-kDa protein (Pi 6.75) and 38-kDa doublet (Pi 6.75 and 6.7 respectively) were confirmed on

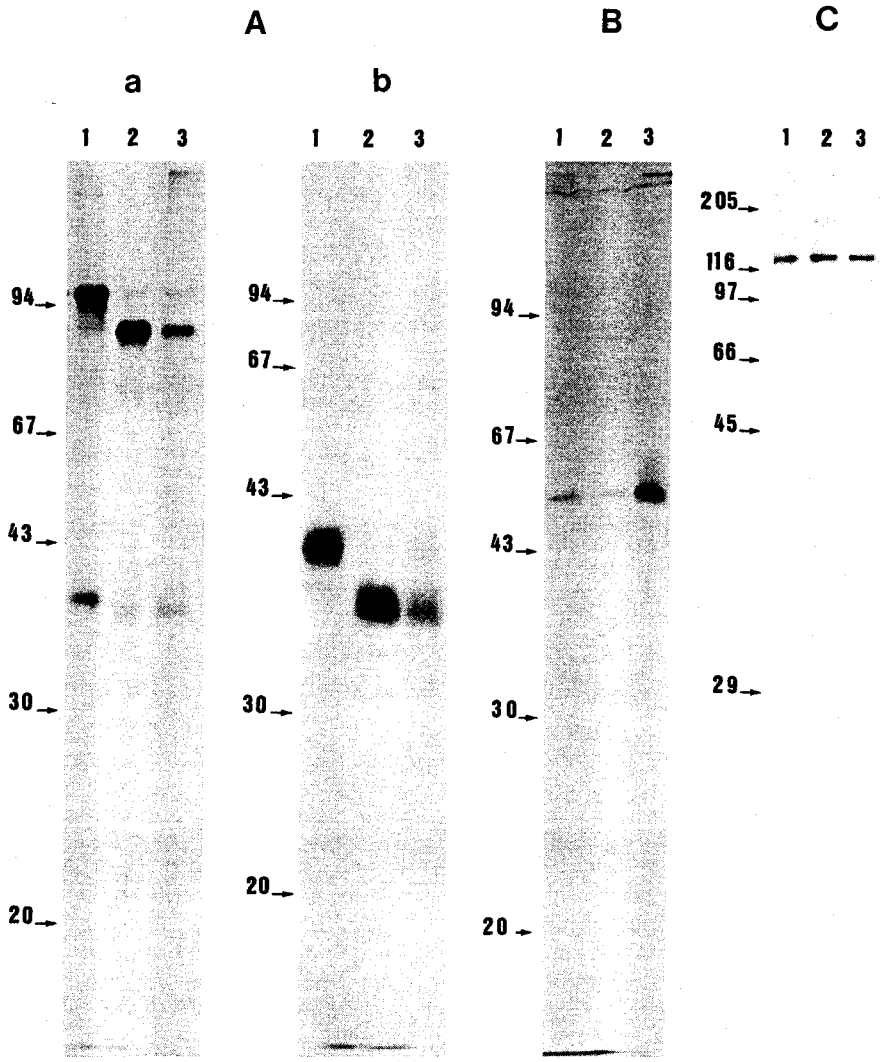


Fig. 6. SDS-PAGE and autoradiography after immunosorption of [^{3}H]AA mixture-labeled *T. gondii* tachyzoites. (A) MAb T4 2F3, analyzed in non-reducing (a) and in reducing (b) conditions; lanes 1, 15-min pulse; lanes 2, 15-min pulse followed by 1-h chase; lanes 3, 4 h labeling. (B) Serum anti-421 (non-reducing conditions): lane 1, 15-min pulse; lane 2, 15-min pulse followed by 1-h chase; lane 3, 4 h labeling. (C) MAb T3 4A11 (reducing conditions): lane 1, 15-min pulse, lane 2, 30-min chase after 15-min pulse, lane 3, 2-h chase after 15-min pulse. The apparent molecular weights ($\times 10^{-3}$) of standard proteins are given (Pharmacia LMW kit, Sigma MW-SDS-200 kit).

autoradiography after immunoprecipitation and 2D-electrophoresis (Fig. 7b).

Discussion

The IFA pattern observed using mAbs T3 4A11, III3E10, T4 2F3 and a polyclonal monospecific sera against recombinant protein 421 were identical with the label being located in the apical area of *T. gondii* zoites. That the label was in the anterior area of zoites was clearly show in intracellular tachyzoite rosettes in which the label was in the distal part of the organism, which has been shown to be the apical complex by electron microscopy. The pattern observed differed from typical labeling of either rhoptries [4] or dense granules. Using immunoelectron microscopy, we did not observe any significant labeling of structures out of the mic-

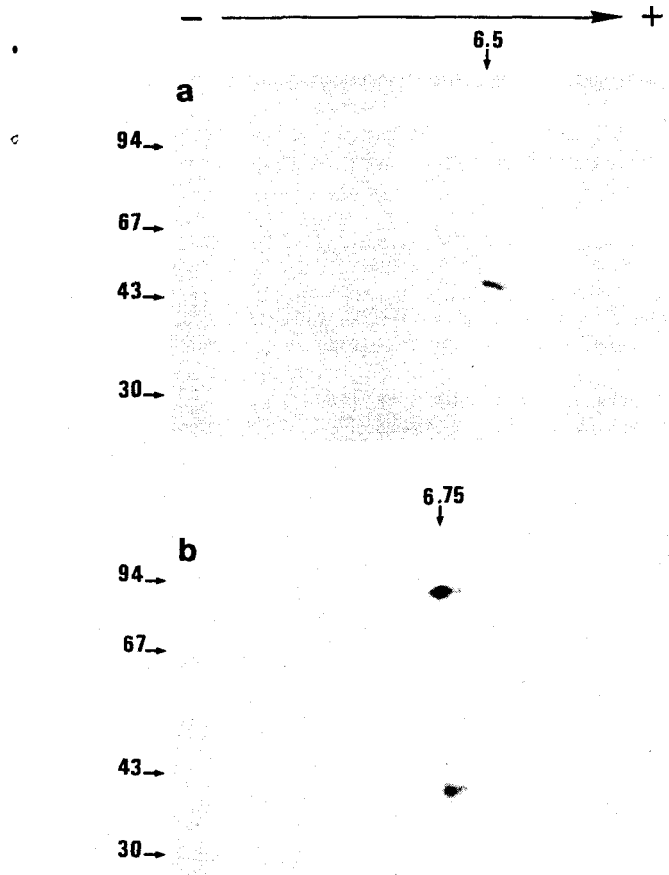


Fig. 7. Two-dimensional electrophoresis in non-reduced conditions and autoradiography of antigens immunoprecipitated from lysates of metabolically labeled *T. gondii* tachyzoites (4 h labeling with [^{3}H]AA mixture) with (a): serum anti-421, (b): mAb T4 2F3. The apparent MW ($\times 10^{-3}$) of standard proteins are given (Pharmacia LMW kit, Sigma MW-SDS-200 kit).

ronemes among the numerous preparations observed. However, the labeling of the micronemes in electron microscopy was heterogenous. This could be explained by the low sensitivity of this technique and by the fact that these organelles are much smaller in diameter than the thickness of sections, which results in a fraction of the organelles seen being actually accessible to antibodies; indeed, antibodies are in contact with one side of the section only and do not label organelles whose contents are not directly exposed on the surface. The unlikely possibility that the microneme population might be heterogenous cannot be completely excluded.

This paper is the first report concerning the contents of *T. gondii* micronemes. Three proteins have been characterized, which we will refer to as Mic 1 (60 kDa, Pi 6.5), Mic 2 (120 kDa, Pi 5), Mic 3 (90 kDa, Pi 6.75). The Mic designation stands for micronemes as the Rop, Sag and Gra have been coined for rhoptries, surface antigens and dense granules, respectively (J. Boothroyd, personal communication and ref. 30). The 3 proteins were found in micronemes of both tachyzoites and bradyzoites, which suggests similar contents for these organelles in both stages of the parasite.

The 3 molecules described could be metabolically labeled with tritiated amino acids; only one (Mic 3, identified by T4 2F3) showed significant post translational modification upon pulse chase analysis. Moreover, this protein was found to undergo a dramatic M_r change from 90 to 38 kDa upon reduction. In addition, Western blot analysis of 2D-electrophoresed tachyzoite demonstrated 2 proteins of 38 kDa with Pi of 6.75 and 6.7, suggesting that the native 90-kDa molecule is an heterodimer. Interestingly, a protein dimer has also been found in *S. tenella* micronemes (ref. 10 and unpublished observation). In the latter case, it is a heterodimer of 20 and 22 kDa with commun epitopes [11]. According to our pulse chase analysis, the 38-kDa molecule is processed from a 40-kDa precursor. A lower molecular weight for the final product is consistent with a proteolytic cleavage. Such processing has also been described for rhoptry proteins in *T. gondii* [4] and *P. falciparum* [29] and may be a common feature of apical organelle contents. An interesting observation is that different molecules undergo different processing within the same organelle since no change in molecular weight was found for the 120- and 60-kDa proteins upon pulse chase. This would mean that a highly specific protease must be involved in the 40 kDa to 38 kDa conversion.

The 60-kDa protein showed a slight shift in electrophoretic migration between reduced and unreduced conditions. This difference could be explained by the presence of intramolecular disulfide bridges as also observed for *T. gondii* surface proteins [22].

We have not been able to investigate precisely the fate of microneme proteins at invasion since the apical fluorescence remained unchanged in intracellular tachyzoites. The progressive diffusion of

labeling around some parasites during intracellular multiplication that was observed by IFA remains to be studied more precisely. No electronmicroscopy data concerning this phenomenon has been obtained so far, due to the lack of sensitivity of the technique. One explanation could be that IFA is detecting the newly synthesized micronemes in the developing daughter tachyzoites within the mother organisms. IFA did not detect microneme proteins in the cytoplasm or membrane of infected cells. Therefore we cannot compare our findings with those of Torii et al. [16] in *P. brasilianum* or the observation of Entzeroth et al. on *Sarcocystis* (personal communication). Neither was any relation found between *T. gondii* micronemes and surface proteins that could recall the finding of Fine [13] or Cochrane et al. [14] on CSP related antigens in *Plasmodium* micronemes. Although we have no experimental data to support this hypothesis, the possibility of micronemes containing receptors involved in parasite host cell interaction as described in *P. knowlesi* [15], is worth further investigation.

Data on micronemes are still too scarce in the literature to get a precise idea on their fate and function. However, our observations of specific contents for micronemes suggest a specific function. The availability of specific antibody and sequence information from molecular cloning of one of these proteins will allow more precise studies on this organelle in *T. gondii* and hopefully help elucide their role.

Acknowledgements

The authors are indebted to C. Ansel, I. Briche, M. Guillotte, A. Loyens and M. Mortuaire for expert assistance. The constant support and interest of Professor A. Vernes and Doctor Y. Moreau are gratefully acknowledged. This work was funded by INSERM, CNRS and Pasteur Mérieux.

References

1 Nichols, B.A., Chiappino, M.L. and O'Connor, G.R. (1983) Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. J. Ultrastruct. Res. 83, 85–98.

2 Kimata, I. and Tanabe, K. (1987) Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. J. Cell Sci. 88, 231–239.

3 Dubremetz, J.F., Sadak A., Taghy, Z. and Fortier B. (1987) Characterization of a 42-kDa Rhoptry antigen of *Toxoplasma gondii*. In: Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections, (Chang, K.P. and Snary, D., eds.), pp. 365–369. Springer-Verlag, Berlin.

4 Sadak, A., Taghy, Z., Fortier, B. and Dubremetz, J.F. (1988) Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 29, 203–211.

5 Schwartzman, J.D.and Krug, E.C. (1989) *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. Exp. Parasitol. 68, 74–82.

6 Sibley, L.D. and Krahenbuhl, J.L. (1988) Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32-kDa protein. Eur. J. Cell Biol. 47, 81–87.

7 Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen G., Cesbron J.Y., Charif H., Lepage P., Darcy, F., Lecocq J.P. and Capron, A. (1989) Molecular characterization of a 23-kDa major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7537–7541.

8 Leriche, M.A., and Dubremetz J.F. (1990) Exocytosis of dense granules after host-cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 76, 559–562.

9 Vivier, E. and Petitprez, A. (1972) Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques, sur *Toxoplasma gondii*. Protistologica, 8, 199–221.

10 Dubremetz, J.F. and Dissous, C. (1980) Characteristic proteins of micronemes and dense granules from *Sarcocystis tenella* zoites (Protozoa, Coccidia). Mol. Biochem. Parasitol. 1, 279–289.

11 Pohl, U., Dubremetz, J.F. and Entzeroth, R. (1989) Characterization and immunolocalization of the protein contents of micronemes of *Sarcocystis muris* cystozoites (Protozoa, Apicomplexa). Parasitol. Res. 75, 199–205.

12 Dubremetz, J.F., Ferreira, E. and Dissous, C. (1989) Isolation and partial characterization of rhoptries and micronemes from *Eimeria nieschulzi* zoites (Sporozoa, Coccidia). Parasitol. Res. 75, 449–454.

13 Fine, E., Aikawa, M., Cochrane, A.H. and Nussenzweig, R.S. (1984) Immuno-electron microscopic observations on *Plasmodium knowlesi* sporozoites: localization of protective antigen and its precursors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33, 220–226.

14 Cochrane, A.H., Uni, S., Maracic, M., Di Giovanni, L., Aikawa, M. and Nussenzweig, R.S. (1989) A circumsporozoite-like protein is present in micronemes of mature blood stages of malaria parasites. Exp. Parasitol. 69, 351–356.

15 Adams, J.H., Hudson, D.E., Torii, M., Ward, G.E., Wellems, T.E., Aikawa, M. and Miller, L.H. (1990) The duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within micronemes of invasive malaria merozoites. Cell 63, 141–153.

16 Torii, M., Matsumoto, Y., Kamboj, K.K., Maracic, M., Guo, S.Q., Nussenzweig, R.S., Aikawa, M. and Cochrane, A.H. (1989) Association of microneme antigens of *Plasmodium brasilianum* merozoites with knobs and other parasite-induced structures in host erythrocytes. Infect. Immun. 57, 596–601.

17 Sabin, A.B. (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Assoc. 116, 801–807.
18 Laugier, M and Quilici, M. (1970) Intérêt expérimental d'une souche de Toxoplasme peu pathogène pour la souris. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 45, 389–403.
19 Cornelissen, A.W.C.A., Overdulve J.M. (1981) Separation of isospora (*Toxoplasma gondii*) cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. Parasitology 83, 103–108.
20 Couzineau, P. and Baufine Ducrocq, H. (1969) Etude des possibilités d'utilisation du sarcome TG 180 de la souris. Application à la Toxoplasmose. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 44, 217–222.
21 Grimwood, B.G., Hechemy, K. and Stevens, R.W. (1979) *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoites propagated in cell culture. Exp. Parasitol. 48, 282–286.
22 Couvreur, G., Sadak A. Fortier B. and Dubremetz J.F. (1988) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitology 97, 1–10.
23 Ullman, A. (1984) One step purification of hybrid proteins which have β-galactosidase activity. Gene 29, 27–31.
24 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
25 Laskey, R.A., and Mills, A.D. (1975) Quantitative film detection of [^{3}H] and [^{14}C] in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56, 335–341.
26 O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4002–4021.
27 Duncan, R. and Hershey, J.W.B. (1984) Evaluation of isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: varation of gel patterns with changing conditions and optimized isoelectric focusing condition. Anal. Biochem. 138, 144–155.
28 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1978) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350–4354.
29 Roger, N., Dubremetz, J.F., Delplace, P., Fortier, B., Tronchin, G. and Vernes, A. (1988) Characterization of a 225 kilodalton rhoptry protein of *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 27, 135–41.
30 Leriche, M.A. and Dubremetz, J.F. (1991) Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 45, 249–260.

Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*

A. ACHBAROU[1], O. MERCEREAU-PUIJALON[2], A. SADAK[1], B. FORTIER[1], M. A. LERICHE[1], D. CAMUS[1] *and* J. F. DUBREMETZ[1]

[1] *Unité 42 INSERM, 369 rue Jules Guesde, 59650 Villeneuve d'Ascq, France*
[2] *Département de Parasitologie Expérimentale, Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France*

(*Received 6 March 1991; revised 4 June 1991; accepted 4 June 1991*)

SUMMARY

The biosynthesis and fate of 4 different dense granule proteins of *Toxoplasma gondii* were studied with 3 monoclonal antibodies raised against tachyzoites and 1 polyclonal antibody raised against a recombinant protein. These proteins have the following molecular weights: 27 kDa (GRA 1), 28 kDa (GRA 2), 30 kDa (GRA 3) and 40 kDa (GRA 4). All four proteins were found in dense granules by immunoelectron microscopy; in *T. gondii*-infected cells, they were found in the vacuolar network but, in addition, GRA 3 was also detected on the parasitophorous vacuole membrane. Therefore, dense granule contents undergo differential targeting when exocytosed in the parasitophorous vacuole. Metabolic labelling and immunoprecipitation showed that GRA 2 and GRA 3 were processed from lower molecular weight precursors, and that GRA 2 and GRA 4 incorporated [^{3}H] glucosamine and are thus likely to be glycosylated.

Key words: *Toxoplasma gondii*, dense granules, parasitophorous vacuole, immunoelectron microscopy, recombinant protein, metabolic labelling.

INTRODUCTION

Invasion of host cells by Sporozoa zoites is a complex event leading to the internalization of the parasite into a vacuole in which it subsequently develops. Several recent investigations on *Plasmodium*, *Sarcocystis* and *Toxoplasma* have confirmed that the organelles of the apical complex contribute to invasion by exocytosis of their contents. Three types of organelles (rhoptries, micronemes, dense granules) have been described and are supposed to perform specific functions. Whereas rhoptries and micronemes have been shown or are suggested to exocytose their contents apically during cell invasion, the contents of dense granules have been shown to be released in the parasitophorous vacuole after invasion and their exocytic site is distinct from the one of rhoptries (Bannister *et al.* 1975; Entzeroth *et al.* 1986; Sibley & Krahenbuhl, 1988; Cesbron-Delauw *et al.* 1988; Torii *et al.* 1989; Aikawa *et al.* 1990; Charif *et al.* 1990; Leriche & Dubremetz, 1990). In *Toxoplasma gondii*, several dense granule proteins have been described: a 32 kDa (Sibley & Krahenbuhl, 1986), a 23 or 27 kDa (Cesbron-Delauw *et al.* 1989; Charif *et al.* 1990; Leriche & Dubremetz, 1990), a 28 kDa (Charif *et al.* 1990; Leriche & Dubremetz, 1991), a 21 kDa (Charif *et al.* 1990), and a 30 kDa (Leriche & Dubremetz, 1991). The 21, 27, 28 and 32 kDa proteins have been shown to be deposited on the vacuolar network which is a tubulomembranous structure that develops in the parasitophorous vacuole after invasion (Sibley *et al.* 1986; Cesbron-Delauw *et al.* 1989; Charif *et al.* 1990; Leriche & Dubremetz, 1990).

We report here the characterization of a new 40 kDa dense granule protein that is also a component of the network, and show that the 30 kDa protein that we had previously identified is targeted to the network and also to the parasitophorous vacuole membrane. This work therefore shows that dense granule proteins are differentially targeted to distinct compartments of the vacuole, which bears important consequences to their respective role in parasite–host cell interactions.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

Two strains of *T. gondii* were used in this study: RH (Sabin, 1941) and 76K (Laugier & Quilici, 1970). The 76K strain was used for the production of bradyzoites. It was passaged every 3 months by oral injection of cysts collected from the brain of infected animals. When required, cysts were purified from infected brain by centrifugation through Percoll (Cornelissen, Overdulve & Hoenderboom, 1981). The RH strain was used for the production of tachyzoites, and was maintained by serial passage in the peritoneal cavity of Swiss mice. Mass production of tachyzoites was achieved by intraperitoneal in-

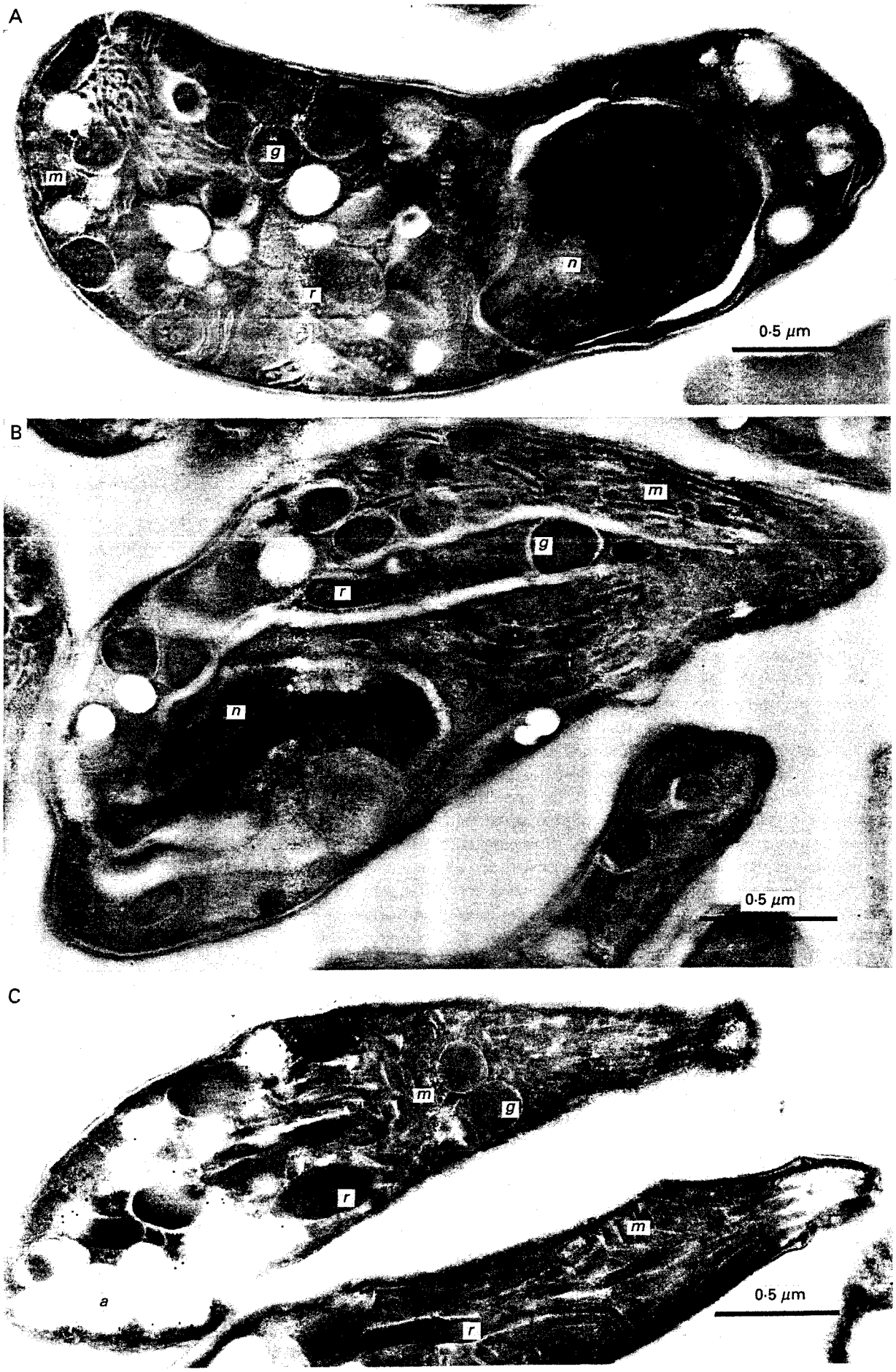


Fig. 1. For legend see opposite.

jection with TG 180 sarcoma cells in mice (Couzineau & Baufine-Ducrocq, 1969). Parasites were also grown *in vitro* on monolayers of Vero or MRC5 cells, maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 5% (Vero) or 10% (MRC5) foetal calf serum. Parasites were purified by glass-fibre filtration (Grimmwood, Hechemy & Stevens, 1979).

Monoclonal antibodies

McAb T4 1F5 was isolated during the screening of hybridomas produced against *T. gondii* as described elsewhere (Sadak *et al.* 1988). McAb T5 2B4 was selected from hybridomas produced against a rhoptry-dense granule subcellular fraction (Leriche & Dubremetz, 1991). McAb T6 2H11 was produced against a post-rhoptry supernatant of tachyzoites (tachyzoite french press homogenate centrifuged for 15 min at 12000 ***g***).

Antibody production against recombinant proteins

Antibodies (Ac 205) were raised in mice against recombinant protein 205 encoded by part of a *T. gondii* gene. The construction of the *T. gondii* genomic library, screening assays and recombinant protein production and purification will be described in detail elsewhere (Mercereau-Puijalon *et al.*, manuscript in preparation). Mice were injected intraperitoneally every 2 weeks with 40 μg of protein emulsified in Freund's complete (first injection) or incomplete (from second injection onwards) adjuvant; sera were collected after the third injection.

Immunofluorescence assay (IFA)

Purified RH tachyzoites or 76K bradyzoites were washed 3 times with PBS and dried on standard IFA slides, which were stored at −20 °C. IFA was performed at 37 °C after 10 min fixation in cold acetone (−20 °C). After incubation for 30 min with McAb or serum (1:25 to 1:100 dilutions in PBS), slides were washed and incubated with a 1:50 dilution of fluorescein-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies. For IFA on intracellular tachyzoites, cells were grown on microscope slides equipped with Flexiperm chambers (Heraeus), infected with tachyzoites and fixed 15 min, 6 h or 24 h later. Cells were fixed with 2% formaldehyde in PBS during 30 min, washed with PBS, and permeabilized in acetone at −20 °C. Incubations were performed at room temperature (20 °C) with ascitic fluids or sera diluted 1:100, followed by fluorescein-conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies.

Immunoelectron microscopy

Tachyzoite-infected TG 180 cells, or purified cysts were fixed for 10 min with 1% formaldehyde and 0·1% glutaraldehyde in PBS or for 15 min with 4% formaldehyde and 0·05% glutaraldehyde in PBS, dehydrated in ethanol and embedded in LR white (London Resin Co). Thin sections were collected on parlodion–carbon coated nickel grids and saturated for 30 min on 2·5% non-fat dry milk and 0·1% Tween 20 in PBS (PBS-milk-Tween). The grids were then floated for 1 h on 500 μg/ml Staphylococcal Protein A in PBS, transferred successively for 1 h each at 20 °C on dilutions of mouse ascitic fluid or serum, followed by anti-mouse IgG–IgM rabbit antibodies, followed by either Protein A-gold (5 or 8 nm) or goat anti-rabbit G20 (Janssen Pharmaceutica) in PBS-milk-Tween. In some cases incubation with mouse ascitic fluid was extended to 16 h at 20 °C. Sections were stained with 4% uranyl acetate in water and observed with a Hitachi HU600 electron microscope.

Metabolic labelling of cultures

A 75 cm^2 monolayer of Vero cells which had been infected 24 h earlier with 5×10^7 tachyzoites isolated from mouse peritoneal fluid was washed with leucine-lysine-phenylalanine-proline-tyrosine-free RPMI medium (Gibco selectamine kit) supplemented with 5% dialysed foetal calf serum and then incubated for 4 h at 37 °C in 20 ml of the same medium containing 200 μCi of tritiated amino acid mixture ([L-4,5-^{3}H]leucine: 163 Ci/mmol.; [L-4,5-^{3}H]lysine: 95 Ci/mmol.; [L-2,3,4,5,6-^{3}H]phenylalanine: 129 Ci/mmol.; [L-2,3,4,5-^{3}H]proline: 105 Ci/mmol.; [L-2,3,4,5,6-^{3}H]tyrosine: 92 Ci/mmol., Amersham). At the end of the labelling period, the medium was removed and the infected cells were lysed for immunoprecipitation experiments. In pulse-chase experiments, 25 cm^2 infected cell monolayers were labelled in the same conditions for 15 min, followed by either immediate lysis or chase in complete culture medium at 37 °C for 1 h before lysis. [^{3}H]glucosamine (Amersham) labelling was performed for 6 h in complete medium as described elsewhere (Tomavo, Schwartz & Dubremetz, 1989).

Fig. 1. Immunolocalization on *Toxoplasma gondii* LR White ultrathin section. (A) Tachyzoite section probed with Ac 205. (B) Tachyzoite section probed with T6 2H11. (C) Bradyzoite sections probed with McAb T4 1F5. Note the specific labelling of dense granules in all cases. *a*, Amylopectin; *g*, dense granules; *m*, micronemes; *n*, nucleus; *r*, rhoptries.

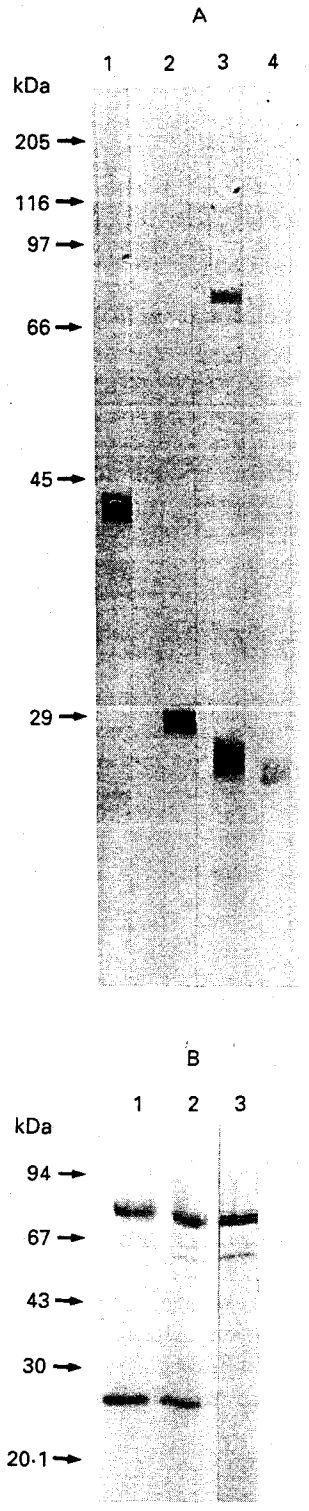


Fig. 2. (A) Western immunoblot of *Toxoplasma gondii* tachyzoites probed with dense granules-specific antibodies after SDS–PAGE under reducing conditions. Lane 1, Ac 205; Lane 2, McAb T6 2H11; Lane 3, McAb T4 1F5; Lane 4, McAb T5 2B4. (B) Western immunoblot probed with McAb T4 1F5 after SDS–PAGE of purified *T. gondii* tachyzoites (Lane 1), *T. gondii*-infected monolayer of Vero cells (lane 2) and uninfected Vero cells (lane 3) under reducing conditions. The apparent molecular weights (kDa) of standard proteins are given (Pharmacia LMW kit, Sigma MW-SDS-200 kit).

Immunosorbent production

McAb immunoglobulins were purified from ascitic fluid by ion-exchange chromatography on DEAE-Trisacryl (IBF) and coupled to CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) at a concentration of 10 mg/ml of gel using the manufacturer's recommended method. Immunoglobulins from mouse immune sera were adsorbed on rabbit anti-mouse IgG adsorbed on Protein A-Sepharose-CL 4 B (Pharmacia).

Immunosorption procedure

Labelled material was lysed with 400 μl of NET (Tris 50 mM, pH 8·3; NaCl 150 mM; ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) 2 mM; aprotinin 0·1 mg/ml; leupeptin 0·01 mg/ml and phenylmethysulphonyl fluoride (PMSF) 1 mM) supplemented with 100 μl of 5% SDS, vortexed and supplemented with 500 μl of NET containing 2% Triton X–100 and 2% deoxycholate (DOC). After agitation for 30 min at room temperature, the lysate was centrifuged at 10000 ***g*** for 10 min and the supernatant fraction collected for immunosorption. Supernatant samples were precipitated with trichloroacetic acid for radioactivity measurements. The immunosorbents were incubated with lysate at room temperature for 2 h under gentle agitation, and washed 6 times with a buffer containing 1 M NaCl, 0·5% Nonidet 40 (NP 40) in 50 mM Tris-HCl, pH 8·3. Elution was then performed during 5 min at 95 °C with electrophoresis sample buffer.

SDS–polyacrylamide gel electrophoresis

SDS–PAGE was performed according to the method described by Laemmli (1970) using a 12% separating gel. Molecular weight markers (Pharmacia, LMW kit; Sigma MW-SDS-200 kit) were used for calibration. Gels were stained with Coomassie blue R, then processed for fluorography (Laskey & Mills, 1975) and exposed to Kodak X-Omat AR film at −80 °C.

Immunoblotting

Tachyzoites of RH strain or purified cysts of 76K strain were analysed by SDS–PAGE and electrophoretically transferred to nitrocellulose (Towbin, Staehelin & Gordon, 1978). The nitrocellulose sheet was saturated for 30 min in 5% non-fat dry milk in 15 mM Tris–HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0·05% Tween 20 (TNT). It was then incubated in antibody (mouse ascitic fluid or serum diluted 1:500 in TNT) for 1 h at room temperature. After washing, the sheet was incubated in alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG diluted 1:7500 in

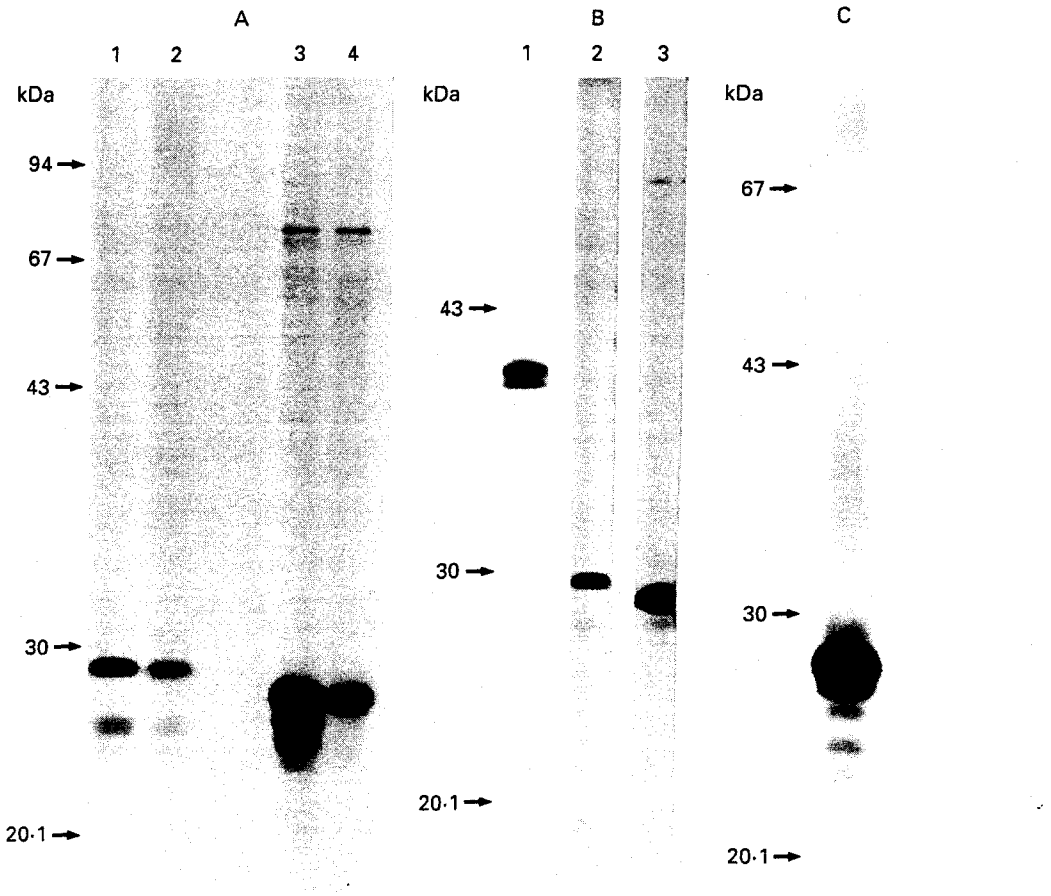


Fig. 3. SDS–PAGE and autoradiography after immunoprecipitation of [^{3}H]amino acid mixture (A and B) or [^{3}H]glucosamine (C) labelled *Toxoplasma gondii* tachyzoites. (A) McAb T6 2H11: 15 min pulse (Lane 1), and 15 min pulse followed by 1 h chase (Lane 2); McAb T4 1F5: 15 min pulse (Lane 3) and 15 min pulse followed by 1 h chase (Lane 4). (B) Immunoprecipitation after 4 h labelling, with Ac 205 (Lane 1), McAb T6 2H11 (Lane 2) and McAb T4 1F5 (Lane 3). (C) McAb T5 1F5 immunoprecipitation after 4 h labelling with [^{3}H]glucosamine. The apparent molecular weights (kDa) of standard proteins are given (Pharmacia LMW kit, Sigma MW-SDS-200 kit).

TNT, and revealed with BCIP (5 bromo-4-indolyl phosphate) and NBT (Nitroblue tetrazolium) (Promega Biotec).

RESULTS

McAbs T4 1F5, T5 2B4 and T6 2H11, as well as Ac 205 labelled small dots located on both sides of the parasite nucleus in the immunofluorescence assay performed on dried tachyzoites or bradyzoites. Immunoelectron microscopic localization showed exclusive labelling of dense granules. In all cases, most of the dense granule sections were labelled (Fig. 1A and B, tachyzoites; C, bradyzoites).

On immunoblots of tachyzoites, Ac 205 reacted with a 40 kDa protein (Fig. 2A1), T6 2H11 with a 30 kDa protein (Fig. 2A2), T4 1F5 with 28 kDa major and 70 kDa minor proteins (Fig. 2A3, B1, B2) and T5 2B4 with a 27 kDa protein (Fig. 2A4). Identical patterns were obtained whether the electrophoresis was run with reduced or unreduced samples. When control blots were performed with T4 1F5 using non-infected cells the 70 kDa was also found (Fig. 2B3), which indicated that this protein is either common to parasites and host cells or only present in host cells since tachyzoites were purified from infected cells and might still contain some host cell contamination. The other antibodies were negative on uninfected cells.

Immunoprecipitation of *Toxoplasma*-infected cells metabolically labelled with a tritiated amino acid mixture also showed that antibodies reacted with distinct proteins. Ac 205 immunoprecipitated a closely migrating doublet with a major upper band at 40 kDa, both in 15 min pulse and after 1 h chase of 4 h labelling (Fig.3B1). McAb T6 2H11 immunoprecipitated 2 bands (at 30 and 26 kDa) after a 15 min pulse (Fig. 3A1) and only a 30 kDa after 1 h chase (Fig. 3A2) or after 4 h labelling (Fig. 3B2). McAb T4 1F5 immunoprecipitated a major 28 kDa together with 2 minor at 26 and 27 after a 15 min pulse (Fig. 3A3) and only a 28 kDa after 1 h chase (Fig. 3A4) or 4 h labelling (Fig. 3B3), whereas the 70 kDa was found in all samples. We could not immunoprecipitate any labelled protein with McAb T5 2B4 under the conditions used. When glu-

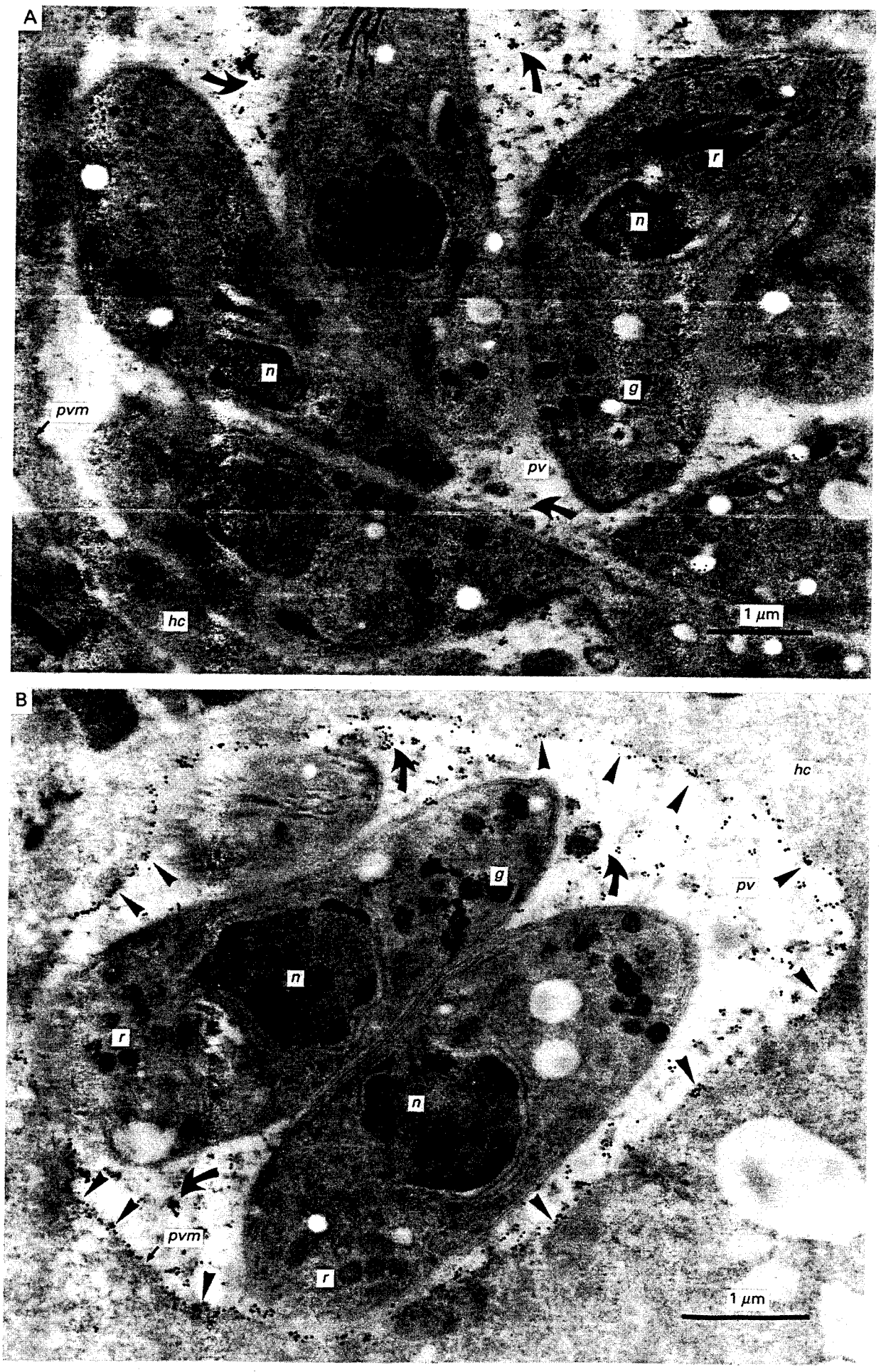


Fig. 4. For legend see opposite.

Table 1. Characterization of granule dense antigens of *Toxoplasma gondii*

Antigen*	Antibody†	M_r‡	IP after [^{3}H]amino acid labelling§ 15 min pulse	15 min +1 h chase	4 h	IP after 4 h [^{3}H]glucosamine labelling§
GRA 1	T5 2B4	27	–	–	–	–
GRA 2	T4 1F5¶	28	28+27+26	28	28	28(27)+26+25
GRA 3	T6 2H11	30	30+26	30	30	–
GRA 4	Ac 205	40–41	40–41	40–41	40–41	40–41

* GRA 1 is similar to the 23 kDa antigen described by Cesbron-Delauw *et al.* (1989) and to the 27 kDa antigen identified by McAb TG17–43 (Charif *et al.* 1990); GRA 2 is similar to the 28·5 kDa antigen identified by McAb TG17–179 used by Charif *et al.* (1990).

† Monoclonal or polyclonal antibody identification.

‡ Apparent molecular weight determined by immunoblotting.

§ Immunoprecipitation profile obtained after metabolic labelling of tachyzoite-infected Vero cells with [^{3}H]glucosamine (4 h) or [^{3}H]amino acid mixture (15 min pulse, 15 min pulse followed by 1 h chase or 4 h labelling).

¶ McAb T4 1F5 also identified a 70 kDa host cell protein.

cosamine labelling was performed, T4 1F5 immunoprecipitated a major 28 kDa (which probably comprised a minor 27 kDa) and 2 other minor bands at 26 and 25 kDa (Fig. 3C); Ac 205 immunoprecipitated a 40 kDa doublet, whereas no radioactive sugar incorporation was detected with McAb T6 2H11.

When IFA was performed on tachyzoite-infected MRC5 cells, Ac 205, McAbs T4 1F5 and T5 2B4 produced a patchy fluorescence located in the vacuolar space as early as 15 min after the addition of parasites on the monolayer. With McAb T6 2H11, a continuous outlining of the vacuoles was observed in addition to the intravacuolar patches.

Immunoelectron microscopy on LR White sections of intracellular parasites showed a specific labelling of the vacuolar network with each of the 4 antibodies (Fig. 4A and B: curved arrow). In addition, McAb T6 2H11 showed an intense labelling of the periphery of the vacuole, corresponding to the parasitophorous vacuole membrane that was not completely preserved by the fixation procedure used for immunodetection (Fig. 4B: arrow head).

DISCUSSION

Four dense granule proteins are described here, 3 of which have already been investigated in part by other authors (Table 1). We propose the name GRA 1 for the 23 kDa protein first described, cloned and sequenced by Cesbron-Delauw *et al.* (1989), identical to 27 kDa protein reacting with McAb T5 2B4 (Leriche & Dubremetz, 1990) and McAb TG 17–43 (Charif *et al.* 1990); GRA 2 is the 28 kDa protein reacting with McAb T4 1F5 (Leriche & Dubremetz, 1991), corresponding to the 28·5 antigen reported by Charif *et al.* (1990); GRA 2 is likely to correspond to the 28 kDa antigen cloned by Prince *et al.* (1989); GRA 3 is the 30 kDa protein reacting with McAb T6 2H11 (Leriche & Dubremetz, 1991). The fourth protein investigated here will be named GRA 4, and is the 40 kDa antigen specifically recognized by serum 205 (Ac 205). Dense granules are likely to contain other proteins, since GRA 3 was shown to be distinct from the 32 kDa protein described by Sibley & Krahenbuhl (1988) by comparing the reactivity of the corresponding McAbs on the same immunoblot (D. Sibley, personal communication), and since Charif *et al.* (1990) also described a 21 kDa dense granule protein.

Using McAb T4 1F5 reacting with GRA 2, we never observed any labelling of the parasite pellicle, which differs from the data reported by Charif *et al.* (1990). Since our McAb also reacts with a 70 kDa protein, whereas the McAb used by Charif does not, both McAbs are likely to react to distinct epitopes of GRA 2. Therefore, they may have different immunodetection properties. The recognition of a 70 kDa by McAb T4 1F5 is a puzzling finding. Additional experiments (not shown) have suggested that this molecule could be a heat-shock protein. It was not found in a purified rhoptry-dense granule fraction (Leriche & Dubremetz, 1991), further demonstrating that this molecule is not colocalized with GRA 2.

Fig. 4. Immunogold localization on intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites. (A) Labelling with McAb T4 1F5. (B) Labelling with McAb T6 2H11. In both cases staining is located on dense granule sections of parasites and on the tubular network of parasitophorous vacuoles (curved arrow); in addition, with McAb T6 2H11, gold particles are associated with the parasitophorous vacuole membrane. *g*, dense granules; *hc*, host cell; m, micronemes; *n*, nucleus; *pv*, parasitophorous vacuole; *pvm*, parasitophorous vacuole membrane; *r*, rhoptries.

Pulse-chase experiments showed no evidence of any metabolic relationship between the 70 kDa protein and GRA 2; we therefore conclude that these 2 molecules are distinct proteins sharing one epitope recognized by McAb T4 1F5. It is not known whether the epitope common to GRA 2 and the 70 kDa protein is conformational or sequential and this will have to be investigated further, especially by comparing the sequence of GRA 2 with known sequences of heat-shock proteins. As observed in the Results section, we have no definitive evidence of the presence of the 70 kDa molecule in tachyzoites since host cell contamination cannot be completely excluded. The incorporation of glucosamine in GRA 2 shows that this molecule is glycosylated, which had been suggested by Charif *et al.* (1990) on the basis of ConA binding. Our data suggest that GRA 2 is derived from lower molecular weight precursors, which is consistent with post-translational glycosylation. Interestingly, the amino acid sequence of the 28 kDa protein cloned by Prince *et al.* (1989) contains two potential glycosylation sites.

GRA 3 is also processed from a low molecular weight precursor but we could not demonstrate glucosamine incorporation. In both cases, it is likely that the mature molecule (28 or 30 kDa) occurs in the dense granule as these molecules are also the major species in purified organelles and in parasite cell lysates (Leriche & Dubremetz, 1991).

The 40 kDa protein has been discovered by screening a *T. gondii* genomic library with the serum of an infected rabbit. This means that this molecule is immunogenic in natural infections and that its protein sequence contains antigenic sites properly folded in *E. coli*. This molecule is therefore of interest if synthetic peptides are to be used for either protection or serology. Indeed, proper mimicking of antigenic sites is far more difficult to achieve for conformational or glycosylated epitopes.

The major finding of this study is that dense granule proteins undergo an uneven distribution within the parasitophorous vacuole after their exocytosis. The 30 kDa protein, GRA 3, was found by immunogold labelling both in the network and the parasitophorous vacuole membrane. The other proteins studied here, GRA 1, GRA 2 and GRA 4 were found in the network only. What is the signal triggering this differential localization? Does the 30 kDa molecule have determinants which interact with molecules on the vacuolar membrane that the other dense granule proteins do not have? Or, alternatively, has GRA 3 the ability to be anchored to or to be integrated in the membrane, which would suppose that it contains an adequate domain, either when synthesized or after exocytosis? It is unlikely that the specific interaction is driven solely by hydrophobic interaction since the network has typical membranous structure. Determining the structure of the GRA 3 protein will be needed to explore its specific distribution further. When one considers that the parasitophorous vacuole is the interface between the actively metabolizing parasite and its host cell, a molecule that is associated with that membrane by the parasite must play a role in this interaction: GRA 3 being a channel or a transporter is a likely hypothesis that has to be investigated further. Studying the differential targeting of dense granule proteins might also help the understanding of the role of the vacuolar network which remains an enigmatic structure. All data reported so far have shown that the dense granule contents of Sporozoa zoites are released in the host cell vacuole after invasion. Their eventual fate is different, however, since in *Sarcocystis muris* the material stays in the vacuole (Entzeroth *et al.* 1986), whereas in *Toxoplasma* it contributes to the network and to the vacuole membrane, and in *Plasmodium falciparum*, at least one of its components (Pf155-RESA) ends up in the host cell membrane (Brown *et al.* 1985; Culvenor, Day & Anders, 1991). It will therefore be of interest to compare the targeting signals of these molecules among Sporozoa, to understand how what seems to be a single organelle could have evolved to contain so many different functional molecules.

The authors are indebted to C. Ansel, I. Briche, M. Guillotte, A. Loyens, M. Mortuaire for expert technical help. This work was funded by INSERM and CNRS.

REFERENCES

AIKAWA, M., TORII, M., SJOLANDER, A., BERSINS, K., PERLMANN, P. & MILLER, L. (1990). Pf155/RESA antigen is localized in dense granules of *Plasmodium faciparum* merozoites. *Experimental Parasitology* **71**, 326–9.

BANNISTER, L. H., BUTCHER, G. A., DENNIS, E. D. & MITCHELL, G. H. (1975). Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites *in vitro*. *Parasitology* **71**, 483–91.

BROWN, G. V., CULVENOR, J. G., CREWTHER, P. E., BIANCO, A. E., COPPEL, R. L., SAINT, R. B., STAHL, H. D., KEMP, D. J. & ANDERS, R. F. (1985). Localization of the ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA) of *Plasmodium faciparum* in merozoites and ring-infected erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine* **162**, 774–9.

CESBRON-DELAUW, M. F., GUY, B., TORPIER, G., PIERCE, R. J., LENZEN, G., CESBRON, J. Y., CHARIF, H., LEPAGE, P., DARCY, F., LECOCQ, J. P. & CAPRON, A. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **86**, 7537–41.

CHARIF, H., DARCY, F., TORPIER, G., CESBRON-DELAUW, M. F. & CAPRON, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Experimental Parasitology* **71**, 114–24.

CORNELISSEN, A. W. C. A., OVERDULVE, J. P. & HOENDERBOOM, J. M. (1981). Separation of Isospora

(*Toxoplasma gondii*) cysts and cystozoites from mouse brain tissue by continous density-gradient centrifugation. *Parasitology* **83**, 103–8.

COUZINEAU, P. & BAUFINE DUCROCQ, H. (1969). Etude des possibilités d'utilisation du sarcome TG 180 de la souris. Application à la Toxoplasmose. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **44**, 217–22.

CULVENOR, J. G., DAY, K. P. & ANDERS, R. F. (1991). *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infection and Immunity* **59**, 1183–7.

ENTZEROTH, R., DUBREMETZ, J. F., HODICK, D. & FERREIRA, E. (1986). Immunoelectronmicroscopic demonstration of the exocytosis of dense granules contents into the secondary parasitophorous vacuole of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa). *European Journal of Cell Biology* **41**, 182–8.

GRIMMWOOD, B. G., HECHEMY, K. & STEVENS, R. W. (1979). *Toxoplasma gondii*: purification of trophozoites propagated in cell culture. *Experimental Parasitology* **48**, 282–6.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* **227**, 680–5.

LASKEY, R. A. & MILLS, A. D. (1975). Quantitative film detection of [^{3}H] and [^{14}C] in polyacrylamide gels by fluorography. *European Journal of Biochemistry* **56**, 335–41.

LAUGIER, M. & QUILICI, M. (1970). Intérêt expérimental d'une sourche de Toxoplasme peu patogeme pour la souris. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **45**, 389–403.

LERICHE, M. A. & DUBREMETZ, J. F. (1990). Exocytosis of dense granules after host-cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* **76**, 559–62.

LERICHE, M. A. & DUBREMETZ, J. F. (1991). Characterization of the proteins of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology* **45**, 249–60.

PRINCE, L. D., ARAUJO, F. J., REMINGTON, J. S., BURG, J. L., BOOTHROYD, J. C. & SHARMA, S. D. (1989). Cloning of cDNA encoding a 28-kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **34**, 3–13.

SABIN, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association* **116**, 801–7.

SADAK, A., TAGHY, Z., FORTIER, N. & DUBREMETZ, J. F. (1988). Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **29**, 203–11.

SIBLEY, L. D. & KRAHENBUHL, J. L. (1988). Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. *European Journal of Cell Biology* **47**, 81–7.

SIBLEY, L. D., KRAHENBUHL, J. L., ADAMS, G. M. W. & WEIDNER, E. (1986). *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *Journal of Cell Biology* **103**, 867–74.

TOMAVO, S., SCHWARZ, R. T. & DUBREMETZ, J. F. (1989). Evidence for glycosyl phosphatidyl inositol anchor of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 4576–80.

TORII, M., ADAMS, J. H., MILLER, L. H. & AIKAWA, M. (1989). Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*. *Infection and Immunity* **57**, 3230–3.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T. & GORDON, J. (1978). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350–4.

CHARACTERIZATION OF MICRONEME AND DENSE GRANULE PROTEINS OF *TOXOPLASMA GONDII*

Summary:

The main goal of our project was the characterization of the contents of two apical organelles of *Toxoplasma gondii*: the micronemes and the dense granules. The probes that we have used were either monoclonal antibodies, produced against tachyzoites or specific antisera produced against recombinant proteins obtained by expressing *Toxoplasma gondii* gene fragments in *E. coli*.

In micronemes, three proteins were identified: Mic 1 (60 kDa, pHi 6,5); Mic 2 (120 kDa, pHi 5) which is associated with two minors proteins of 116 kDa (pHi 5,95) and 110 kDa (pHi 5,95) and Mic 3 (90 kDa, pHi 6,75) which is an heterodimer of two 38 kDa–polypeptides of pHi 6,75 and 6,7 respectively, that are processed from precursors of 40 kDa. Mic 1 and Mic 3 could be metabolically labeled with tritiated glucosamine, and are therfore likely to be glycosylated.

With respect to tachyzoite–host cell interaction, Mic 1 was shown to bind specifically to the host cell surfaces. Mic 2 showed a processing associated with host cell invasion, leading to the 116 and 110 kDa products.

We have also studied the biochemical characteristics of four dense granule proteins (Gra 1: 27 kDa, pHi 4,8; Gra 2: 28 kDa, pHi 7,8; Gra 3: 30 kDa and
Gra 4: 40–41 kDa) and their differential targetting in the host cell at different steps of tachyzoite–host cell interaction. Gra 2 and Gra 3 are processed from precursors of lower molecular weight. Gra 2 is probably glycosylated but Gra 3 do not show any incorporation of glucosamine or fatty acids. The 40 and 41 kDa molecules are two forms of Gra 4 of which only the 41 kDa protein can be labeled with tritiated glucosamine.

The tubulo–membranous network that develops in the parasitophorous vacuole, is derived at last in part from the dense granule contents. Exocytosis of these organelles has been shown at the end of the invasion, and all of the identified dense granule proteins have been localised in the network. Gra 3 is the only protein that was also found associated with the parasitophorous vacuole membrane.

These preliminary results suggest that micronemes in *Toxoplasma gondii* may contribute to recognition and attachement to the host cell as suggested for other Apicomplexan. Dense granule exocytosis is likely to be triggered by vacuolar environnement; the contents of these organelles play a role in parasitophorous vacuole maturation. Identification of a parasitic protein (Gra 3) in the parasitophorous vacuole membrane suggests a role in the parasite–host cell exchange for this protein.

Keys words: *Toxoplasma gondii*,micronemes, dense granules, parasitophorous vacuole, exocytosis.

CARACTERISATION DE PROTEINES DES MICRONEMES ET DES GRANULES DENSES CHEZ *TOXOPLASMA GONDII*

Résumé:

Notre travail a porté sur la caractérisation du contenu de deux types d'organites du complexe apical de *Toxoplasma gondii*: les micronèmes et les granules denses. Nous avons utilisé, au cours de cette étude, des sondes immunologiques: soit des anticorps monoclonaux, produits contre des tachyzoïtes, soit des anticorps polyclonaux, produits contre des protéines recombinantes obtenues par l'expression dans *E. coli* de fragments du gène de *Toxoplasma gondii*. Une protéine de 80 kDa à été identifiée au niveau du conoïde des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Cette protéine dérive d'un précurseur de 84 kDa.

Dans les micronèmes, trois protéines distinctes ont été identifiées: Mic 1 (60 kDa, pHi 6,5), Mic 2 (120 kDa; pHi 5) qui est associée à deux protéines mineures de 116 et 110 kDa et de pHi identique de 5,95, et Mic 3 (90 kDa; pHi 6,75) un hétérodimère formé de deux sous unités synthétisées sous forme de précurseurs de 40 kDa qui subissent une protéolyse aboutissant à deux unités de 38 kDa et de pHi 6,75 et 6,7 respectivement. Mic 1 et Mic 3 incorporent la glucosamine et sont donc probablement glycosylées.

Lors de l'étude des interactions des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* avec des cellules Véro, MRC5 ou TG180, nous avons mis en évidence une affinité de Mic 1 pour la surface des cellules hôtes. Mic 2 subit une maturation lors de l'invasion et donne naissance aux protéines de 116 et 110 kDa.

Nous avons également étudié les caractéristiques biochimiques de quatre protéines des granules denses de *Toxoplasma gondii* (Gra 1: 27 kDa, pHi 4,8; Gra 2: 28 kDa, pHi 7,8; Gra 3: 30 kDa et Gra 4: 40–41 kDa) ainsi que leur distribution lors des différentes étapes de l'interaction entre des tachyzoïtes et les cellules hôtes. Gra 2 et Gra 3 dérivent de précurseurs de plus faible poids moléculaire. La protéine native et les précurseurs de Gra 2 incorporent la glycosamine, Gra 3 n'incorpore ni la glucosamine ni les acides gras radiomarqués. Les protéines de 40 et 41 kDa sont deux formes de Gra 4 dont seule la protéine de 41 kDa serait glycosylée.

Le contenu des granules denses participe à l'édification du réseau tubulo–membranaire qui se développe autour des parasites en prolifération dans la vacuole parasitophore. L'exocytose de ces organites a été observée dès la fin de l'invasion et toutes les protéines identifiées (Gra 1 à 4) ont été localisées dans l'espace vacuolaire. Gra 3 s'associe en plus à la membrane de la vacuole parasitophore.

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus suggèrent que les micronèmes, chez *Toxoplasma gondii*, pourraient contribuer aux processus de reconnaissance et d'attachement du parasite à la cellule hôte lors de l'invasion, comme cela a été suggéré pour d'autres Apicomplexa. L'environnement vacuolaire déclencherait l'exocytose des granules denses. Le contenu de ces organites contribuerait à la maturation de la vacuole parasitophore. La mise en évidence d'une protéine parasitaire (Gra 3) sur la membrane de la vacuole parasitophore évoque pour cette protéine un rôle dans les échanges avec la cellule hôte.

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

Mots clés: *Toxoplasma gondii*, micronèmes, granules denses, vacuole parasitophore, exocytose.